



HAL
open science

Caractérisation structurale et séquençage de carbohydrates par spectroscopie infrarouge intégrée à la spectrométrie de masse

Baptiste Schindler

► **To cite this version:**

Baptiste Schindler. Caractérisation structurale et séquençage de carbohydrates par spectroscopie infrarouge intégrée à la spectrométrie de masse. Optique [physics.optics]. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1313 . tel-01616006v1

HAL Id: tel-01616006

<https://theses.hal.science/tel-01616006v1>

Submitted on 13 Oct 2017 (v1), last revised 13 Oct 2017 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2016LYSE1313

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N° 52
Physique & Astrophysique de Lyon

Spécialité de doctorat : Physique

Soutenue publiquement le 15/12/2016, par :
Baptiste Schindler

Caractérisation structurale et séquençage de carbohydrates par spectroscopie infrarouge intégrée à la spectrométrie de masse

Devant le jury composé de :

RICARD-BLUM Sylvie, PU, Université de Lyon	Présidente
LISACEK Frédérique, Chercheure, Swiss Institute of Bioinformatics	Rapporteuse
PEREZ Serge, DR, CNRS	Rapporteur
DANIEL Régis, DR, CNRS	Examineur
COMPAGNON Isabelle, MCF-HDR, Université de Lyon	Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier chaleureusement les membres de mon jury pour leurs remarques pertinentes et le temps qu'ils ont consacré à la lecture de cette thèse quelque peu « technico-rugueuse ».

Au cours de ces trois années passées à l'ILM, j'ai eu la chance d'interagir avec des personnalités très variées et ces échanges furent pour moi riches d'un point de vue scientifique et personnel. Je souhaite donc dans ces quelques lignes qui suivent remercier les différents acteurs de ma mutagénèse : de pharmacien à pharmacien-physicien.

Tout d'abord, Isabelle Compagnon qui a eu le courage d'accepter pour ce projet de spectroscopie IRMPD sur des sucres, un pharmacien sachant se servir d'un tournevis. Merci donc de m'avoir fait découvrir entre autres deux domaines passionnants : la spectroscopie laser et le tricot.

Franck Lépine et Christian Bordas pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe : Structure & Dynamique Multi-échelles des Édifices Moléculaires. Je remercie également les autres permanents de l'équipe Vincent, Bruno et Gulabi ainsi que Richard et Éric qui nous ont rejoints récemment. C'est dans cet environnement où les échanges scientifiques et gustatifs sont nombreux que les conditions me semblent le plus propice à l'acquisition de connaissances et de compétences. Je n'oublie pas également, Victor, Alexandre, Gina, et Gabriel, mes collègues de bureau avec qui j'ai eu la chance de partager cet espace réduit de vie et de travail.

Les théoriciens de l'ILM, Allouche et Loïc pour les nombreuses discussions et les échanges que nous avons eu sur l'accord entre spectres IRMPD et spectres IR théoriques. Je les remercie également pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté lorsque je me suis lancé dans mes premiers calculs théoriques.

Mes stagiaires : Nassiba, Sihem et Gabrielle. J'espère qu'elles garderont un bon souvenir de leur séjour en salle de manip et je compte sur elles pour diffuser les nombreux avantages et la force de la spectroscopie IRMPD : Merci, Спасибо,

شكرا

Tout le personnel administratif et technique qui ont permis le bon déroulement de cette thèse, et en particulier Jacques pour toute la mécanique, Christian pour l'électronique, Marc pour le vide, et Claude et Françoise pour ce qui est du ressort administratif.

Tous les membres de FELIX, avec qui nous avons passé quatre mois à vivre à la mode Hollandaise, c'est-à-dire à nous nourrir quasi-exclusivement de toasties. Entre autres, nos voisins de manip, Anouk, Bin et Daniël ; Miriam pour les aspects logistiques ; Lex et Britta sans qui nous n'aurions pas eu accès au « *Far-IR* ».

M^{me} Compagnon pour avoir eu la gentillesse d'accepter de relire ma thèse pour y débusquer mes fautes d'orthographe.

Enfin, je souhaite remercier mes amis pour m'avoir soutenu, détendu et écouté lors de ces trois années. Mais aussi toute ma Famille pour l'aide qu'ils m'ont apporté et le temps qu'ils ont consacré pour confectionner un pot représentatif de la Lorraine et de sa convivialité.

Table des matières

GLOSSAIRE	13
INTRODUCTION.....	17
1. Bibliographie	21
CHAPITRE I LA SPECTROSCOPIE IRMPD POUR L'ANALYSE DE BIOMOLÉCULES	23
1. La spectroscopie IRMPD	25
1.1. Principe de la spectroscopie IRMPD	25
1.1.1. Le processus IRMPD.....	25
1.1.2. Réalisation d'un spectre IRMPD.....	26
1.2. Performances de la spectroscopie IRMPD	27
1.2.1. Avantages et inconvénients de la spectroscopie IRMPD	27
1.2.2. Avantages et inconvénients liés au laser utilisé	28
1.2.3. Comparaison spectre IRMPD et spectre infrarouge en phase condensée.....	29
2. Développements instrumentaux	30
2.1. Couplage LCQ/OPO.....	31
2.1.1. Dispositif expérimental	31
2.1.2. Performances du dispositif expérimental	32
2.1.3. Temps d'analyse	33
2.1.4. Conditions typiques d'analyse	34
2.2. Couplage LTQ XL/OPO.....	35
2.2.1. Dispositif expérimental	35
2.2.2. Comparaison des performances des couplages LTQ XL/OPO et LCQ/OPO	36
2.2.3. Conditions HPLC/LTQ XL/OPO.....	37
2.3. Couplage LCQ/LEL/OPO	37

2.3.1. Dispositif expérimental	38
2.3.2. Expériences LCQ/LEL.....	39
2.3.3. Expériences LCQ/OPO/LEL	39
2.4. Support théorique aux expériences	39
2.5. Ouverture à la communauté scientifique	40
3. Illustration du potentiel analytique de l'IRMPD pour la différenciation de molécules isobariques.....	40
3.1. Glucosamine 6-sulfate et glucosamine 6-phosphate.....	40
3.2. La nature de la modification	41
3.3. Liaison hydrogène, structure, comparaison expérience / théorie.....	43
3.4. Conclusion	47
4. Bibliographie	49
CHAPITRE II SÉQUENÇAGE DE CARBOHYDRATES PAR COUPLAGE MS/IR	53
1. Différenciation des monosaccharides	55
1.1. Protoné	55
1.1.1. N-acétyl hexosamine.....	55
1.1.1.1. Analyse conformationnelle de la N-acétyl glucosamine.....	55
1.1.1.2. Différenciation des isomères de la famille des N-acétyl hexosamines.....	58
1.1.2. Hexosamine	60
1.2. Adduit	61
1.3. Déprotoné.....	62
1.4. Conclusion	63
2. Différenciation des disaccharides	64
2.1. Nature	64
2.2. Position de la liaison	65
2.3. Stéréo de la liaison.....	66
2.4. Séquence	67
2.5. Conclusion	68
3. Informations retenues lors de la fragmentation	68

3.1. Fragment Y.....	68
3.2. Fragment C	70
3.3. Fragment B	72
3.4. Fragment Z.....	74
3.5. Principe du séquençage par MS ⁿ /IR.....	75
4. Application à l'identification d'un oligosaccharide	76
4.1. Séquençage d'un tétrasaccharide de chitosan	77
4.1.1. Analyse des constituants : les monosaccharides	78
4.1.1.1. MS ⁿ	78
4.1.1.2. MS ⁿ /IR.....	80
4.1.2. Analyse des constituants : les disaccharides.....	82
4.1.2.1. MS ⁿ	82
4.1.2.2. MS ⁿ /IR.....	83
4.2. Exemples d'applications du séquençage	84
4.2.1. Mélange de chitosans	84
4.2.2. GAGs : identification de l'acide hexuronique.....	86
4.3. Perspectives et conclusions	87
5. Bibliographie	90

CHAPITRE III ISOMÈRES DE POSITION, APPLICATION AUX

GLYCOSAMINOGLYCANES..... 93

1. Glucosamine 3-sulfate vs. glucosamine 6-sulfate protonées.....	95
1.1. Région OPO.....	95
1.1.1. Glucosamine 6-sulfate	95
1.1.2. Glucosamine 3-sulfate	97
1.1.3. Comparaison de la glucosamine 6-sulfate et 3-sulfate protonée entre 2700 et 3700 cm ⁻¹	99
1.2. Région LEL.....	100
1.2.1. Glucosamine 6-sulfate	100
1.2.2. Glucosamine 3-sulfate	101
1.2.3. Comparaison de la glucosamine 6-sulfate et 3-sulfate protonée dans la région 700-1800 cm ⁻¹	102
1.3. Conclusion	103
2. Étude de monosaccharides sulfatés déprotonés.....	103

2.1. Région LEL.....	104
2.2. Région OPO.....	105
2.2.1. Identification de différents monosaccharides sulfatés	105
2.2.2. Glucosamine 6-sulfate	106
2.2.3. Glucosamine 3-sulfate	107
2.2.4. Conclusion	108
3. Application à l'analyse des glycosaminoglycanes	109
3.1. Les héparines	110
3.1.1. Spectre IRMPD dans la région 550-1750 cm ⁻¹	111
3.1.2. Spectre IRMPD dans la région 2800-3700 cm ⁻¹	112
3.1.3. Limites de l'identification des isomères de position par MS/MS	113
3.2. Les chondroïtines sulfates: un cas compliqué	114
3.2.1. Spectres MS/MS des disaccharides de référence CS-A et CS-C.....	115
3.2.1.1. Fournisseur 1 : CS-A (1) et CS-C (2).....	115
3.2.1.2. Fournisseur 2 CS-A (2) et CS-C (2).....	116
3.2.1.3. Comparaison.....	116
3.2.2. Spectre IRMPD des disaccharides de référence CS-A et CS-C dans la région 2800-3700 cm ⁻¹ ... 116	
3.2.2.1. Fournisseur 1.....	116
3.2.2.2. Fournisseur 2.....	117
3.2.2.3. Comparaison.....	117
3.2.3. Séquençage.....	118
3.2.3.1. Différence entre N-acétyl galactosamine 4-sulfate et N-acétyl galactosamine 6-sulfate	118
3.2.3.2. Analyse des fragments des disaccharides CS-A et CS-C.....	119
3.2.4. Conclusion	120
3.3. Séquençage d'un fragment de dermatane sulfate dp4	121
3.3.1. Spectre de masse du tétrasaccharide	121
3.3.2. Fragmentations du tétrasaccharide	122
3.3.2.1. Forme [M-3H] ³⁻	122
3.3.2.2. Forme [M-2H] ²⁻	123
3.3.2.3. Sélection des fragments à analyser par MS/IR.....	123
3.3.3. Spectres IRMPD des fragments et comparaison aux références	124
3.4. Conclusion	125
4. Bibliographie	126

CHAPITRE IV LA SPECTROSCOPIE IRMPD RÉVOLUE EN ISOMÈRES ET EN CONFORMÈRES..... 129

1. La glucosamine : un cas modèle et complexe131

1.1. Spectre IRMPD de la glucosamine entre 2800 et 3700 cm^{-1} 131

1.2. Comparaison expérience / théorie : anomère α 132

1.3. Comparaison expérience / théorie : anomère β 133

1.4. Conclusion 134

2. Spectroscopie dans l'infrarouge lointain135

2.1. Comparaison de la glucosamine et de ses anomères α et β méthylés 135

2.1.1. Spectres IRMPD entre 700 et 1800 cm^{-1} 135

2.1.2. Spectres IRMPD entre 300 et 700 cm^{-1} 136

2.1.3. Spectres IRMPD entre 100 et 300 cm^{-1} 137

2.2. Théorie ${}^4\text{C}_1/{}^1\text{C}_4$ 138

2.2.1. Région 700-1800 cm^{-1} 138

2.2.2. Région 300-700 cm^{-1} 139

2.2.3. Région 100-300 cm^{-1} 140

2.3. Conclusion 140

3. Spectroscopie d'extermination : 2 couleurs (IR lointain/proche IR)141

3.1. Extermination d'une conformation à 3554 cm^{-1} 142

3.2. Extermination d'un anomère à 606 cm^{-1} 143

3.3. Extermination d'un anomère à 893 cm^{-1} 144

3.4. Extermination d'une conformation à 1124 cm^{-1} 145

3.5. Conclusion 146

4. Couplage HPLC/MS/IR pour l'analyse en ligne147

4.1. Analyse d'un mélange de régio-isomères 147

4.1.1. Séparation chromatographique de GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc et de GlcNAc $\beta(1\rightarrow6)$ GlcNAc 147

4.1.2. Analyse en ligne du mélange 148

4.1.2.1. Spectre de fragmentation 148

4.1.2.2. Spectres IRMPD..... 149

4.1.3. Avantages par rapport à une analyse MS/IR seule..... 150

4.2. Analyse d'un mélange de stéréo-isomères 151

4.2.1. Séparation chromatographique de Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc et de Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc	151
4.2.2. Analyse en ligne du mélange	152
4.2.2.1. Spectres de fragmentation.....	152
4.2.2.2. Spectres IRMPD.....	153
4.3. Séparation des anomères	154
4.3.1. Séparation chromatographique de la glucosamine	154
4.3.2. Analyse en ligne de la glucosamine par HPLC/MS/IR.....	155
4.3.2.1. Séparation de la glucosamine à bas débit.....	155
4.3.2.2. Spectres de fragmentation.....	155
4.3.2.3. Spectres IRMPD.....	156
4.4. Conclusion et perspectives	157
5. Bibliographie	159
CONCLUSION	163
ANNEXES.....	167
1. Analyse conformationnelle réalisée dans le cadre de la thèse de Loïc Barnes	167
1.1. <i>N</i> -acétyl hexosamines	167
1.1.1. <i>N</i> -acétyl galactosamine.....	167
1.1.2. <i>N</i> -acétyl mannosamine	168
1.2. Hexosamines.....	169
1.2.1. Galactosamine	169
1.2.2. Mannosamine	170
2. Articles en collaboration	172
2.1. Insights into the fragmentation pathways of gas-phase protonated sulfoserine.....	172
2.2. Exploring the catalytic mechanism of ATP conversion at the molecular level: Binding and docking probed by Mass Spectrometry	173
2.3. Bottom-up elucidation of the stereochemistry of the glycosidic bond	174
3. Liste d'articles.....	176

Glossaire

De nombreux termes sont employés pour parler des sucres et dépendent des domaines et des habitudes de chacun. Voici donc une sélection de différents mots utilisés pour les identifier : glucide, carbohydrate, ose, oside, saccharide, glycane.

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

CID : Dissociation induite par collision

CLIO : Centre Laser Infrarouge d'Orsay

CS-A : Disaccharide de chondroïtine sulfate où la *N*-acétyl galactosamine est sulfatée en position 4, Δ UA-[1→3]-GalNAc4S

CS-C : Disaccharide de chondroïtine sulfate où la *N*-acétyl galactosamine est sulfatée en position 6, Δ UA-[1→3]-GalNAc6S

DFT : Théorie de la fonctionnelle de la densité

DIMS : Spectrométrie de Mobilité Ionique Différentielle

dp : degré de polymérisation

DTIMS : Spectrométrie de Mobilité Ionique en Tube de Dérive

EDD : Dissociation par Détachement d'Électron

ESI : ionisation par électronébuliseur

FELIX : Centre laser infrarouge de l'université de Nijmegen (Free Electron Laser for Infrared eXperiments)

GAG : Glycosaminoglycane

GVPT2 : approche théorique traitant les modes de vibration comme des potentiels anharmoniques (generalized second order vibrational perturbation theory)

HILIC : mode chromatographique utilisant une phase stationnaire polaire et des éluants comme l'acétonitrile et l'eau (hydrophilic interaction liquid chromatography)

HPAEC : Chromatographie ionique adaptée à la séparation de molécules chargées (High-Performance Anion-Exchange Chromatography)

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

HuGO : Human Genome Organisation

HS : Héparane Sulfate

Hp : Héparine

IRMPD : Dissociation par absorption multiple de photons infrarouges

IVR : processus de redistribution de l'énergie grâce à des couplages vibrationnels intramoléculaires

LCQ : spectromètre de masse constitué d'un piège d'ions tridimensionnel

LEL : Laser à Électrons Libres

LID : Dissociation Induite par Laser

LTQ XL : spectromètre de masse constitué d'un piège d'ions linéaire

MALDI : Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice

MS : Spectrométrie de Masse

MS/MS : spectrométrie de masse en tandem, un ion est sélectionné, fragmenté puis les masses obtenues sont analysées (équivalent à MS²)

MSⁿ : même principe que pour une séquence MS/MS sauf que celle-ci est répétée plusieurs fois, avec n correspondant au nombre d'étapes de sélection des ions et d'analyse en masse.

MS/IR : Spectroscopie infrarouge réalisée sur un ion sélectionné en masse

MSⁿ/IR : Spectroscopie infrarouge réalisée sur un ion sélectionné en masse après avoir effectué une séquence MSⁿ

Nd:YAG : Cristal de grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme utilisé dans les lasers YAG qui émettent classiquement des photons de longueur d'onde valant 1064 nm

OPO/OPA : Oscillateur Paramétrique Optique, Amplification Paramétrique Optique. C'est un système laser accordable en longueur d'onde

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

TWIMS : mobilité ionique développée par la compagnie Waters[®] (travelling-wave ion mobility spectrometry)

« Le monde est fait de sucre et de poussière. »

Alfred Döblin

Introduction

Trois grandes classes de biopolymères sont présentes dans la nature et permettent d'expliquer le vivant. Les polynucléotides comme l'ADN contiennent le code génétique des organismes et sont constitués de quatre nucléotides principaux reliés entre eux de façon linéaire. Pour un dinucléotide, il existe alors 16 combinaisons possibles. Les polymères d'acides aminés que sont les peptides et les protéines assurent diverses fonctions biologiques au sein des organismes. Ce sont des polymères linéaires et un total de 22 acides aminés communs différents sont impliqués dans la formation de peptides ou de protéines, ce qui donne pour un dipeptide 484 combinaisons différentes.

La dernière classe de biopolymères est celle des carbohydrates dont la structure est plus complexe. Elle est composée d'une part d'une grande diversité de constituants dont notamment 6 pentoses ($C_5H_{10}O_5$), 12 hexoses ($C_6H_{12}O_6$), 2 désoxy-hexoses ($C_6H_{12}O_5$), et 2 nonoses ($C_9H_{17}NO_8$) qui peuvent être décorés par diverses modifications structurales. D'autre part, chacun de ces monosaccharides peut former une liaison glycosidique à partir de son hydroxyle en position 1 vers tous les hydroxyles d'un second monosaccharide et celle-ci possède deux configurations différentes α et β . En considérant uniquement les dix plus abondants monosaccharides retrouvés chez les mammifères, le nombre de combinaisons pour un disaccharide est de 1360.[1] De plus alors que les deux autres classes de biopolymères sont linéaires, les polysaccharides sont régulièrement branchés ce qui entraîne une complexité supplémentaire et enfin les différents constituants peuvent être modifiés en différentes positions (O-acétylés, sulfatés, phosphorylés ou méthylés) ce qui rajoute un nombre considérable de possibilités pour un disaccharide.

La famille des protéines est la première classe des biopolymères pour laquelle une méthode de séquençage basée sur la chromatographie a été développée et utilisée dès 1945.[2,3] Ensuite, la structure de l'ADN a été déterminée à partir du diagramme de diffraction X en 1953[4] mais il a fallu toutefois attendre 24 ans pour que la première séquence d'ADN d'un bactériophage soit déterminée[5] et qu'une méthode permette le séquençage rapide de brins d'ADN.[6,7] Le projet HuGO ayant pour but de séquencer le génome humain a démarré en 1989 et c'est enfin en 2001 que la séquence brute de celui-ci fut publiée.[8]

Dans ces mêmes périodes, le développement de la spectrométrie de masse et des sources d'ionisation comme la source MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) ou ESI (Electrospray Ionization) ont permis de démocratiser l'étude des biomolécules.[9,10] Cette technique d'analyse a ainsi permis le développement rapide de la protéomique,[11,12] qui a pour objet de séquencer le protéome. Ces découvertes ont permis de nombreuses avancées dans le domaine de la santé grâce à une meilleure compréhension des mécanismes biologiques.[13,14]

En parallèle, l'étude du glycome, nécessaire afin d'identifier clairement la structure des protéines qui sont majoritairement glycosylées,[15–17] a débuté en se basant sur les mêmes techniques d'analyse, c'est-à-dire la spectrométrie de masse.[18–24]. C'est une méthode d'analyse performante qui est largement utilisée mais qui se trouve limitée lorsqu'il s'agit d'identifier directement des oligosaccharides ou même des monosaccharides puisque son observable est la masse et que de nombreuses isoméries sont présentes dans cette classe de biomolécules. En effet, Il est nécessaire pour identifier un oligosaccharide de différencier plusieurs isoméries : la nature des constituants de l'oligosaccharide, la séquence et les branchements de ceux-ci, la configuration anomérique des liaisons glycosidiques, la position des liaisons glycosidiques, et enfin la nature et la position des modifications. Toutefois, la spectrométrie de masse possède des avantages indéniables puisqu'elle est peu consommatrice d'échantillons et est adaptée à des analyses rapides ce qui en fait un outil intéressant pour la glycomique.[23,25,26] Le couplage avec un autre instrument afin d'obtenir une observable supplémentaire s'avère donc nécessaire pour différencier ces isomères et très vite, des méthodes basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse et de la mobilité ionique ont fait leur apparition pour résoudre ces isoméries sans toutefois être appliquée de façon systématique.[27–29]

D'un autre côté, des méthodes spectroscopiques existent et sont également utilisées pour analyser des carbohydrates. La spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) s'avère être un outil performant pour l'étude des oligosaccharides notamment dans l'identification d'O-antigènes bactériens et les spectroscopies Infrarouge et Raman sont également performantes pour analyser les carbohydrates[30,31] mais ces deux dernières restent toutefois peu utilisées. Malheureusement, ces

méthodes spectroscopiques nécessitent des quantités importantes d'échantillon purifié et ces étapes de purification prennent du temps et le risque de perte d'informations labiles comme les O-acétylations est très important.[32,33]

La classe des carbohydrates demeure encore insuffisamment décrite, puisque l'étude des oligosaccharides reste de nos jours difficile et aucune méthode n'a été capable de permettre à elle seule le séquençage systématique de ceux-ci. Toutefois il reste primordial d'identifier les carbohydrates qui jouent des rôles importants dans les systèmes biologiques et sont entre autres liés à l'immunité ainsi qu'aux mécanismes cellulaires et cancéreux.[34–39] De plus, l'impact de leur séquençage ne concerne pas uniquement la santé mais également d'autres domaines comme ceux des bioénergies, de l'alimentation ou des matériaux. C'est pourquoi l'Europe et les États-Unis ont clairement identifié la nécessité de développer des outils afin de les caractériser.[40,41]

Ce manuscrit présentera les résultats obtenus dans l'équipe Structure & Dynamique Multi-échelles des Édifices Moléculaires de l'Institut Lumière Matière spécialisée dans l'étude de molécules complexes en phase gazeuse en utilisant des dispositifs instrumentaux couplant des méthodes de spectroscopie laser avec entre autre la spectrométrie de masse. Ce type de couplage permet d'obtenir de façon simultanée la masse et le spectre optique d'une molécule et combine les avantages de la masse (sensibilité, résolution en masse) et ceux de la spectroscopie (résolution structurelle et identification d'isomères). La spectroscopie IRMPD (Infrared Multiphoton Dissociation) réalisée grâce au couplage d'un laser infrarouge accordable et d'un piège à ions sera utilisée afin de développer de nouveaux outils dédiés à la caractérisation et au séquençage d'oligosaccharides.

Dans le Chapitre I, la spectroscopie IRMPD qui est la méthode choisie dans ce manuscrit afin de caractériser la structure d'oligosaccharides sera présentée. Après une brève description des processus impliqués dans cette spectroscopie, les avantages et les inconvénients de cette technique seront soulignés. À partir de ce constat, les différents développements instrumentaux réalisés afin de repousser les limitations de la spectroscopie IRMPD seront décrits. Enfin, la méthode théorique utilisée par Loïc Barnes dans le cadre de sa thèse (équipe de chimie théorique de l'Institut Lumière Matière) afin d'interpréter les spectres IRMPD sera brièvement présentée. À titre d'exemple, le couplage du spectromètre de masse à piège d'ions (LCQ) avec le laser infrarouge accordable (OPO) sera utilisé pour réaliser les spectres IRMPD de deux molécules isobariques : la glucosamine 6-phosphate et la glucosamine 6-sulfate. Une étude conformationnelle de la glucosamine 6-phosphate sera également présentée afin d'attribuer une structure à ce monosaccharide en phase gazeuse et ainsi identifier la résolution de la spectroscopie IRMPD.

Dans le chapitre II, les premiers principes du séquençage d'oligosaccharides par spectroscopie IRMPD seront établis. Pour cela, la pertinence de cette métrique sera étudiée pour la résolution des différentes isoméries présentes dans la famille des carbohydrates. Premièrement, la possibilité d'identifier des monosaccharides de même masse grâce à leur spectre IRMPD sera présentée. Ensuite, nous nous intéresserons aux différentes isoméries liées à la régio- ou à la stéréochimie de la liaison glycosidique. Grâce à ces différentes études, la spectroscopie IRMPD apparaît comme une technique pertinente pour discriminer les différents isomères de mono- ou disaccharides. Ensuite, la conservation de ces informations après fragmentation d'oligosaccharides sera mise en évidence permettant ainsi d'envisager cette approche comme une technique générique pour séquencer les carbohydrates. Enfin dans la suite de ce chapitre, le protocole de séquençage complet d'un oligosaccharide sera discuté et l'utilisation de cette méthode pour répondre rapidement à des questions spécifiques sur la séquence, la position d'une désacétylation ou l'identification de la nature d'un des constituants d'un tétrasaccharide sera présentée.

Le chapitre III de ce manuscrit est consacré à l'étude et à la caractérisation des motifs de sulfatation, qui sont des décorations très communes, notamment dans la classe des glycosaminoglycanes. Dans un premier temps, la sensibilité de la technique dans deux gammes spectrales, 700-1800 et 2700-3700 cm^{-1} , sera discutée sur deux monosaccharides sulfatés dans deux états de charge différents : protoné et déprotoné. Dans un second temps, les spectres IRMPD de disaccharides monosulfatés de même masse seront comparés entre eux ainsi qu'aux résultats obtenus par MS/MS. Enfin la méthode de séquençage développée et présentée dans le chapitre II sera utilisée pour identifier la position du sulfate sur deux disaccharides de chondroïtine sulfate pour lesquels la signature MS/MS est ambiguë. Enfin, cette technique sera appliquée au séquençage d'un tétrasaccharide disulfaté afin d'identifier la position des deux groupements sulfate sur cet oligosaccharide.

Pour terminer, dans le chapitre IV, le spectre IRMPD de la glucosamine sera présenté dans une gamme spectrale étendue allant de 100 à 3700 cm^{-1} . Ce spectre s'avère être une combinaison de la signature infrarouge de trois formes présentes en phase gazeuse pour ce monosaccharide. Afin d'attribuer les différentes bandes observées, le spectre IRMPD de la glucosamine sera comparé aux spectres IRMPD des anomères α et β de la glucosamine méthylée et à des spectres infrarouges théoriques calculés par DFT (Density functional theory). L'utilisation de deux méthodes séparatives sera abordée dans le but d'obtenir des signatures IRMPD résolues en isomères et/ou en conformères : l'une spectroscopique basée sur l'utilisation de deux lasers infrarouges, et l'autre basée sur un couplage avec la chromatographie liquide qui permet de séparer les espèces en amont de leur étude spectroscopique.

1. Bibliographie

1. Werz, D. B.; Ranzinger, R.; Herget, S.; Adibekian, A.; von der Lieth, C.-W.; Seeberger, P. H. Exploring the Structural Diversity of Mammalian Carbohydrates (“Glycospace”) by Statistical Databank Analysis. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 685–691.
2. Sanger, F. The free amino groups of insulin. *Biochem. J.* **1945**, *39*, 507.
3. Sanger, F. Chemistry of insulin. *Science* **1959**, *129*, 1340–1344.
4. Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
5. Sanger, F.; Air, G. M.; Barrell, B. G.; Brown, N. L.; Coulson, A. R.; Fiddes, J. C.; Hutchison, C. A.; Slocombe, P. M.; Smith, M. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* **1977**, *265*, 687–695.
6. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 5463–5467.
7. Deininger, P. L. Random subcloning of sonicated DNA: Application to shotgun DNA sequence analysis. *Anal. Biochem.* **1983**, *129*, 216–223.
8. Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W.; others Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860–921.
9. Karas, M.; Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299–2301.
10. Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, *246*, 64–71.
11. Aebersold, R.; Goodlett, D. R. Mass Spectrometry in Proteomics. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 269–296.
12. Domon, B.; Aebersold, R. Mass spectrometry and protein analysis. *science* **2006**, *312*, 212–217.
13. Humphery-Smith, I.; Blackstock, W. Proteome analysis: genomics via the output rather than the input code. *J. Protein Chem.* **1997**, *16*, 537–544.
14. Pandey, A.; Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **2000**, *405*, 837–846.
15. Gahmberg, C. G.; Tolvanen, M. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 308–311.
16. Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **1999**, *1473*, 4–8.
17. Spiro, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **2002**, *12*, 43R–56R.
18. Hofmeister, G. E.; Zhou, Z.; Leary, J. A. Linkage position determination in lithium-cationized disaccharides: tandem mass spectrometry and semiempirical calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5964–5970.
19. Küster, B.; Wheeler, S. F.; Hunter, A. P.; Dwek, R. A.; Harvey, D. J. Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: in-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **1997**, *250*, 82–101.
20. Rudd, P. M.; Dwek, R. A. Rapid, sensitive sequencing of oligosaccharides from glycoproteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 488–497.
21. Harvey, D. J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom. Rev.* **1999**, *18*, 349–450.
22. Chai, W.; Piskarev, V.; Lawson, A. M. Negative-Ion Electrospray Mass Spectrometry of Neutral Underivatized Oligosaccharides. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 651–657.
23. Zaia, J. Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom. Rev.* **2004**, *23*, 161–227.
24. Tissot, B.; North, S. J.; Ceroni, A.; Pang, P.-C.; Panico, M.; Rosati, F.; Capone, A.; Haslam, S. M.; Dell, A.; Morris, H. R. Glycoproteomics: Past, present and future. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 1728–1735.
25. Zaia, J. Mass spectrometry and glycomics. *Omics J. Integr. Biol.* **2010**, *14*, 401–418.

26. Wuhrer, M. Glycomics using mass spectrometry. *Glycoconj. J.* **2013**, *30*, 11–22.
27. Liu, Y.; Clemmer, D. E. Characterizing Oligosaccharides Using Injected-Ion Mobility/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2504–2509.
28. Lee, S.; Wyttenbach, T.; Bowers, M. T. Gas phase structures of sodiated oligosaccharides by ion mobility/ion chromatography methods. *Honour Chava Lifshitz* **1997**, *167–168*, 605–614.
29. Gabryelski, W.; Froese, K. L. Rapid and sensitive differentiation of anomers, linkage, and position isomers of disaccharides using High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry (FAIMS). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 265–277.
30. Kuhn, L. P. Infrared spectra of carbohydrates. *Anal. Chem.* **1950**, *22*, 276–283.
31. Cael, J. J.; Koenig, J. L.; Blackwell, J. Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **1974**, *32*, 79–91.
32. Phalipon, A.; Costachel, C.; Grandjean, C.; Thuizat, A.; Guerreiro, C.; Tanguy, M.; Nato, F.; Vulliez-Le Normand, B.; Belot, F.; Wright, K.; Marcel-Peyre, V.; Sansonetti, P. J.; Mulard, L. A. Characterization of Functional Oligosaccharide Mimics of the *Shigella flexneri* Serotype 2a O-Antigen: Implications for the Development of a Chemically Defined Glycoconjugate Vaccine. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 1686–1694.
33. Perepelov, A. V.; Shekht, M. E.; Liu, B.; Shevelev, S. D.; Ledov, V. A.; Senchenkova, S. N.; L'vov, V. L.; Shashkov, A. S.; Feng, L.; Aparin, P. G.; Wang, L.; Knirel, Y. A. *Shigella flexneri* O-antigens revisited: final elucidation of the O-acetylation profiles and a survey of the O-antigen structure diversity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2012**, *66*, 201–210.
34. Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
35. Dwek, R. A. Glycobiology: toward understanding the function of sugars. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
36. Rudd, P. M.; Elliott, T.; Cresswell, P.; Wilson, I. A.; Dwek, R. A. Glycosylation and the immune system. *Science* **2001**, *291*, 2370–2376.
37. Haltiwanger, R. S.; Lowe, J. B. Role Of Glycosylation In Development. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 491–537.
38. Ohtsubo, K.; Marth, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* **2006**, *126*, 855–867.
39. Pinho, S. S.; Reis, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 540–555.
40. *Transforming Glycoscience: A Roadmap for the Future*; The National Academies Press: Washington, DC, **2012**.
41. Flitsch et al. A roadmap for Glycoscience in Europe, a joint EGSF/IBCarb publication, **2015**.

Chapitre I

La spectroscopie IRMPD pour l'analyse de biomolécules

Faits marquants

2013 : Construction du dispositif IRMPD LCQ/OPO (page 31)

2013 : Premier spectre IRMPD de sucre dans la région des 3 μm
(page 40)

2014 : Premier couplage à l'infrarouge lointain et 2 couleurs
LEL/OPO (page 37)

2016 : Construction du premier couplage HPLC/MS/IR
(page 35)

La spectroscopie IRMPD, à ne pas confondre avec la fragmentation IRMPD, est une méthode couplant spectromètre de masse et lasers infrarouges afin d'obtenir un spectre vibrationnel. Elle fut initialement utilisée avec des lasers CO₂ accordables autour de 10 μm (1000 cm⁻¹) et sur de petites molécules carbonées.[1] Puis avec la construction de lasers à électrons libres, la gamme spectrale fut étendue (5 à 10 μm) et cette technique est alors, en premier lieu, utilisée pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques.[2]

Puis dans le début des années 2000, et avec l'essor des sources d'ionisation douce (MALDI/ESI), elle a su trouver sa place pour l'analyse structurale de biomolécules comme les acides aminés et a permis d'identifier leur conformation en phase gazeuse lors de complexations avec des métaux.[3,4] En parallèle, l'utilisation de lasers OPO infrarouges accordables dans la région des 3 μm (3700-3000 cm⁻¹) s'est développée dans le même but : l'étude de biomolécules.[5,6] Enfin la spectroscopie IRMPD a été utilisée pour s'intéresser aux mécanismes de fragmentation en spectrométrie de masse, et à identifier la structures de fragments après CID (Collision Induced Dissociation). Ceci a entre autres permis de déterminer des mécanismes de réarrangements de peptides qui surviennent lors de la fragmentation par CID.[7-9]

À la vue des performances de la spectroscopie IRMPD pour identifier les différentes conformations adoptées en phase gazeuse par des biomolécules, cette méthode semble pertinente pour discriminer des molécules isomériques. Elle a donc été utilisée tout d'abord pour différencier les anomères α et β de monosaccharides méthylés à l'aide d'un laser CO₂ accordable[10] ou de disaccharides avec le laser à électrons libres FELIX.[11-13]

De son côté, la région des 3 μm a été explorée pour l'analyse des carbohydrates mais en utilisant une autre méthode, la spectroscopie IR/UV double résonance qui permet d'étudier des molécules neutres en phase gazeuse. Le spectre infrarouge des molécules est enregistré grâce à l'utilisation d'un schéma spectroscopique utilisant à la fois un laser UV et un laser infrarouge.[14] Cette région s'avère particulièrement intéressante et hautement informative pour distinguer des anomères ou des isomères,[15-18] toutefois cette technique requiert la présence d'un chromophore qui n'est pas présent sur un sucre naturel.

Dans ce chapitre, le processus impliqué derrière la spectroscopie IRMPD sera présenté ; ce qui permettra de comprendre la façon dont le spectre vibrationnel est obtenu. Ensuite les avantages et inconvénients de cette spectroscopie seront décrits et les performances de cette méthode seront comparées dans la région des 3 μm avec celles obtenues par spectroscopie infrarouge en phase condensée. Les développements instrumentaux réalisés lors de cette thèse afin de repousser les limites de l'IRMPD seront présentés. Cette méthode spectroscopique sera enfin appliquée à un cas de

monosaccharides isobariques dans le but de valider la pertinence de cette méthode dans la région des 3 μm pour différencier des carbohydrates et étudier leur structure.

1. La spectroscopie IRMPD

1.1. Principe de la spectroscopie IRMPD

1.1.1. Le processus IRMPD

La spectroscopie infrarouge conventionnelle est une technique d'analyse structurale très utile pour identifier les groupements chimiques présents dans un échantillon purifié. Elle est basée sur la mesure de l'absorption de la lumière transmise par l'échantillon à analyser selon la loi de Beer-Lambert où A est l'absorbance, I l'intensité de la lumière transmise et I_0 l'intensité de la lumière incidente.

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

Une autre technique d'analyse structurale permet d'obtenir le spectre vibrationnel de molécules ionisées en phase gazeuse : c'est la spectroscopie IRMPD. Elle repose sur le couplage de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie laser infrarouge qui permet de réaliser le spectre de molécules isolées à l'intérieur d'un piège à ions. Cependant, dans le cas de la spectroscopie IRMPD, la densité de molécules à l'intérieur du piège à ions est très faible, puisque seulement quelques centaines d'ions y sont isolés. Or à chaque impulsion laser, environ 10^{17} photons sont injectés au centre du piège ce qui signifie que la différence entre l'intensité de la lumière transmise (au maximum quelques centaines de photons) et l'intensité de la lumière incidente est trop faible pour mesurer l'absorption directe de la lumière par ces ions en phase gazeuse.

Dans ce cas, une autre observable est nécessaire pour obtenir une information sur l'absorption de la molécule. En spectroscopie IRMPD, l'observable indirecte de l'absorption de photons par la molécule est la fragmentation de cette dernière, c'est ce qui est appelé une spectroscopie d'action. Lorsqu'un ion est irradié à une longueur d'onde correspondant à la fréquence de l'un de ses modes de vibration, celui-ci va être excité selon la transition $v_0 \rightarrow v_1$ comme représenté sur la figure 1. Puisque la molécule est en phase gazeuse, elle ne va pas pouvoir se relaxer dans le milieu ambiant et cette énergie vibrationnelle va alors se redistribuer sur tous les modes de vibration de la molécule par des couplages intramoléculaires (IVR).[19–21] La molécule pourra alors réabsorber un photon de même énergie, par excitation de la transition $v_0 \rightarrow v_1$ puis le même processus de redistribution de l'énergie intervient. Ces différentes étapes sont reproduites jusqu'à ce que l'énergie interne de la molécule atteigne l'énergie de dissociation de la liaison la plus faible qui va alors se fragmenter ce qui est directement observable

par spectrométrie de masse. Il est à noter que seule la transition $v_0 \rightarrow v_1$ est excitée et les états vibrationnels supérieurs ne sont pas atteints dans ce processus.

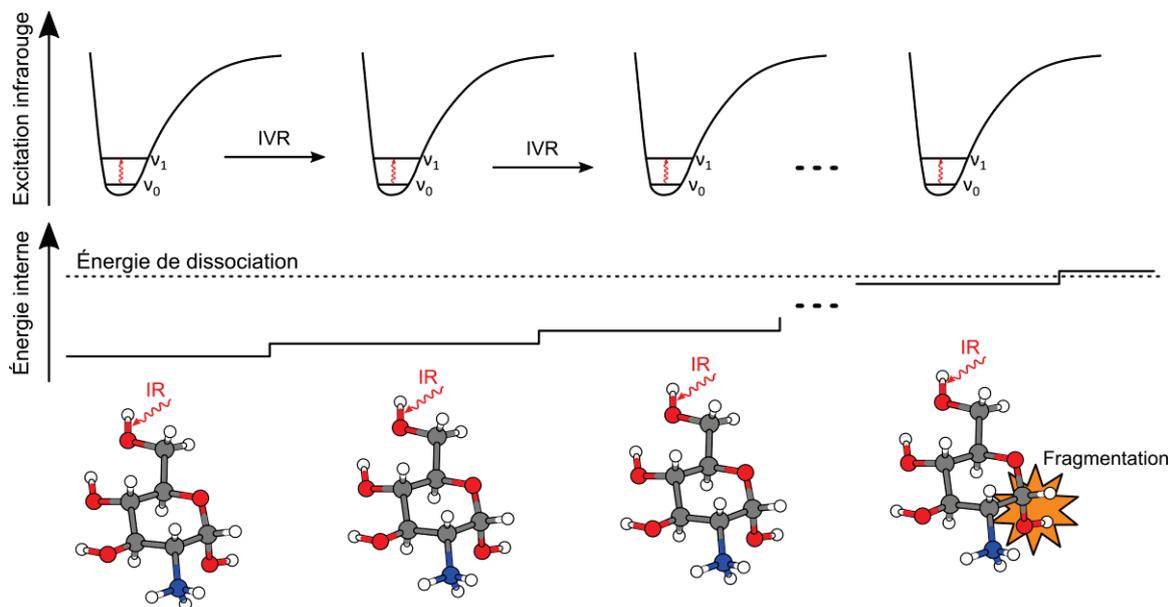


Figure 1 : Schéma de principe du processus IRMPD

1.1.2. Réalisation d'un spectre IRMPD

Pour cette spectroscopie d'action, l'observable est donc la fragmentation de la molécule induite par irradiation laser et une formule dérivée de la loi de Beer-Lambert permet de calculer le taux de photofragmentation à partir de I_{parent} l'intensité du signal de l'ion parent et de $\sum I_{fragment}$ la somme de l'intensité des signaux des ions fragments.

$$photofragmentation = -\log\left(\frac{I_{parent}}{I_{parent} + \sum I_{fragment}}\right)$$

Afin d'obtenir un spectre IRMPD, il est nécessaire de répéter cette mesure indirecte de l'absorption de la lumière pour chacune des longueurs d'onde de l'intervalle de mesure d'intérêt. Comme représenté sur la figure 2, lorsque la molécule absorbe à une longueur d'onde donnée, celle-ci va alors se fragmenter tandis que dans le cas où elle n'absorbe pas à cette longueur d'onde, aucune fragmentation ne sera observée. Le spectre IRMPD est alors reconstruit en calculant pour chaque nombre d'onde, le taux de photofragmentation. Dans la suite de cette thèse, les spectres IRMPD obtenus sont tracés en affichant chacun des points mesurés, ainsi qu'une ligne correspondant à une moyenne glissante sur cinq points afin d'aider à la visualisation du spectre expérimental.

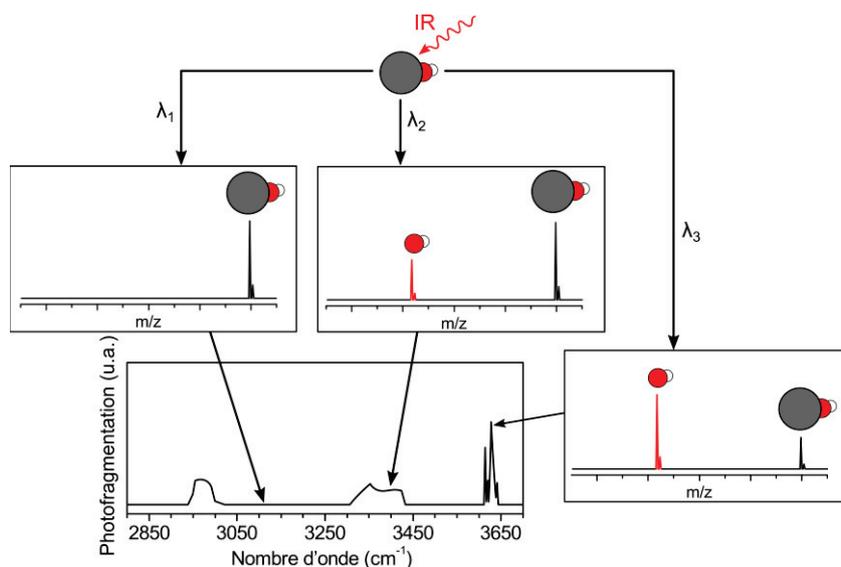


Figure 2 : Schéma représentant l'acquisition d'un spectre IRMPD. Après irradiation de la molécule à une longueur d'onde λ , une photofragmentation est observée uniquement si elle absorbe pour cette valeur de λ . Le spectre IRMPD est reconstruit en traçant le taux de photofragmentation en fonction du nombre d'onde

1.2. Performances de la spectroscopie IRMPD

1.2.1. Avantages et inconvénients de la spectroscopie IRMPD

La spectroscopie IRMPD bénéficie des avantages de la spectrométrie de masse pour la production d'ions en phase gazeuse, c'est-à-dire qu'elle nécessite peu d'échantillon, et grâce à la source électrospray, il est possible de mettre en phase gazeuse et d'ioniser une variété importante de molécules, même celles qui sont peu volatiles comme les protéines ou les oligosaccharides. De plus, il n'est pas nécessaire d'utiliser des espèces purifiées puisqu'il est possible d'isoler la molécule d'intérêt grâce à sa masse et donc de travailler sur des mélanges complexes. Enfin cette méthode est très sensible d'un point de vue structural puisqu'il est possible d'identifier la conformation adoptée en phase gazeuse par une molécule ou un complexe ou encore de différencier des molécules de même masse grâce à leur empreinte spectroscopique.

En revanche, un temps conséquent est requis pour enregistrer un spectre IRMPD puisqu'il est nécessaire d'irradier les ions pendant plusieurs centaines de millisecondes et de répéter l'irradiation pour chacun des nombres d'onde de la région infrarouge étudiée. Enfin, la spectroscopie IRMPD reste limitée à l'étude d'échantillons ne contenant pas de molécules isobariques afin de ne pas encombrer le spectre vibrationnel puisqu'il n'est pas possible de les séparer grâce à leur masse. Enfin pour couvrir une gamme spectrale allant de 500 à 4000 cm^{-1} , l'utilisation de plusieurs lasers est nécessaire.

1.2.2. Avantages et inconvénients liés au laser utilisé

Cette spectroscopie nécessite une source de lumière intense et accordable en longueur d'onde afin d'explorer une gamme spectrale spécifique. Toutefois, il n'existe pas de lasers continuellement accordables sur toute la gamme infrarouge, il est donc nécessaire d'identifier la gamme spectrale la plus pertinente pour obtenir des informations structurales sur la molécule à étudier. La figure 3 représente les principaux modes observés en spectroscopie IRMPD et plus particulièrement dans le cas de biomolécules comme les sucres. Deux régions se dessinent, l'une en dessous de 1800 cm^{-1} et l'autre au-dessus de 2700 cm^{-1} .

La région accessible avec les lasers à électrons libres, comprise entre 500 et 2000 cm^{-1} comprend les modes d'élongation des C=O, C-O, et C-C qui permettent d'obtenir une empreinte spectroscopique du squelette de la molécule. Les modes d'élongation des modifications post-glycosylationnelles telles que la sulfatation ou la phosphorylation sont également présents dans cette gamme spectrale. De plus, les lasers à électrons libres ont l'avantage de délivrer une grande puissance laser permettant au processus IRMPD d'être très efficace pour une grande variété de molécules et d'états de charge différents. Enfin la gamme spectrale peut être étendue, puisque FELIX permet d'atteindre 40 cm^{-1} et ainsi explorer les modes de vibration présents dans l'infrarouge lointain. Néanmoins ces caractéristiques ont un coût puisque ces lasers comme FELIX ou CLIO nécessitent une très lourde infrastructure[22,23] et sont donc peu envisageables pour une utilisation en routine dédiée à l'analyse de biomolécules.

La deuxième classe de lasers permettant de réaliser la spectroscopie IRMPD est celle des lasers CO_2 qui possèdent une bonne puissance de sortie mais qui sont limités par une très faible gamme d'accordabilité restreinte autour de $10\text{ }\mu\text{m}$ [1,24] et n'a pas été utilisé dans cette thèse.

Enfin, la dernière catégorie de lasers utilisée pour réaliser la spectroscopie IRMPD est celle des lasers OPO infrarouge accordables entre 2700 et 3700 cm^{-1} mais délivrant une puissance plus modeste que les lasers précédents. Cette région permet d'observer les modes d'élongation C-H, N-H et O-H de la molécule et donne une information sur la conformation adoptée par celle-ci en allant sonder les différentes liaisons hydrogène. Toutefois l'obtention de spectres IRMPD peut s'avérer difficile lorsque l'énergie de dissociation est élevée dans certains modes d'ionisation comme le mode négatif ou lors de fortes complexations avec des métaux puisque la puissance laser n'est pas suffisante pour obtenir une photofragmentation de la molécule. En général, ce type de dispositif est employé pour la spectroscopie d'ions protonés, dont l'énergie de fragmentation est abaissée par la présence d'un proton mobile.[25–27] La gamme spectrale de ces lasers peut être étendue jusque 800 cm^{-1} mais dans ce cas, la puissance laser est trop faible pour induire la photofragmentation à plusieurs photons des

molécules. Par contre ces dispositifs lasers sont relativement compacts ce qui permet d'imaginer d'utiliser cette méthode IRMPD dans des laboratoires afin de caractériser la structure de biomolécules.

Chaque laser à ses avantages et ses inconvénients, mais chacun permet le développement de la spectroscopie IRMPD pour la caractérisation structurale de biomolécules : explorer les informations obtenues dans l'infrarouge lointain grâce aux grands instruments, mais aussi développer cette méthode d'analyse pour une utilisation de la gamme des 3 μm en laboratoire.

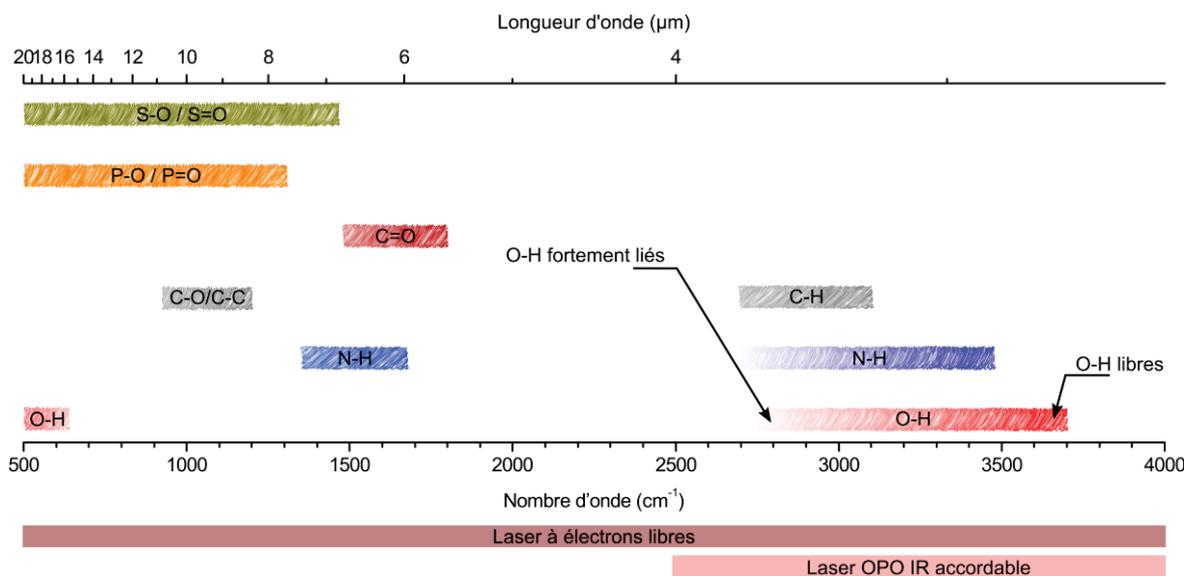


Figure 3 : Représentation des principaux modes de vibrations observés entre 500 et 4000 cm^{-1} pour des carbohydrates

1.2.3. Comparaison spectre IRMPD et spectre infrarouge en phase condensée

Le spectre IR en phase condensée est obtenu entre 4000 et 500 cm^{-1} en n'utilisant qu'un seul appareillage contrairement à l'acquisition d'un spectre IRMPD qui nécessite plusieurs lasers pour couvrir cette gamme. Les différentes régions accessibles à l'aide de lasers sont représentées sur la figure 3, la région 3700-2700 cm^{-1} où un laser de table OPO infrarouge accordable peut être utilisé et la région 1800-500 cm^{-1} qui requiert l'utilisation d'un laser à électrons libres. De même, le temps d'acquisition pour obtenir le spectre IR en phase condensée entre 4000-500 cm^{-1} est de seulement quelques minutes. Par contre, il est actuellement d'environ 40 minutes pour la gamme spectrale 3700-2700 cm^{-1} dans le cas du spectre IRMPD d'une molécule isolée en phase gazeuse sur notre dispositif expérimental, et supérieur à une heure si un laser à électrons libres est utilisé.

Dans un souci de convention, alors que les spectres IR en phase condensée sont représentés par ordre décroissant de nombre d'onde, les spectres IRMPD en phase gazeuse sont eux classiquement représentés par ordre croissant de nombre d'onde. De même alors que la transmission est représentée

en ordonnée dans le cas des spectres IR en phase condensée, la photofragmentation qui représente l'absorption est choisie comme ordonnée pour les spectres IRMPD.

Puisque la spectroscopie IRMPD s'intéresse à des molécules isolées en phase gazeuse à l'intérieur d'un piège à ions, une meilleure résolution spectroscopique est obtenue. En effet, comme le montre la figure 4 qui compare le spectre IR obtenu en phase condensée (a) et le spectre IRMPD en phase gazeuse (b) de la glucosamine 6-sulfate entre 2800 et 3700 cm^{-1} , ces deux spectres sont très différents. Celui en phase condensée est constitué dans cette région correspondant aux modes OH/NH/CH de deux massifs principaux larges de plusieurs centaines de nombres d'ondes et faiblement résolus, l'un autour de 2925 cm^{-1} et le second autour de 3300 cm^{-1} . En revanche, le spectre IRMPD de la glucosamine 6-sulfate est composé entre 2800 et 3700 cm^{-1} de huit bandes principales, observées à 2943, 2975, 3255, 3333, 3541, 3582, 3605 et 3633 cm^{-1} . Ces bandes sont larges en moyenne d'une dizaine de nombres d'ondes et cette finesse par rapport au spectre IR en phase condensée s'explique par l'absence de liaisons intermoléculaires entre les molécules de glucosamine 6-sulfate puisque celles-ci sont isolées en phase gazeuse, ainsi que par l'absence de liaisons intermoléculaires avec le solvant présent dans le milieu pour les spectres IR en phase condensée.

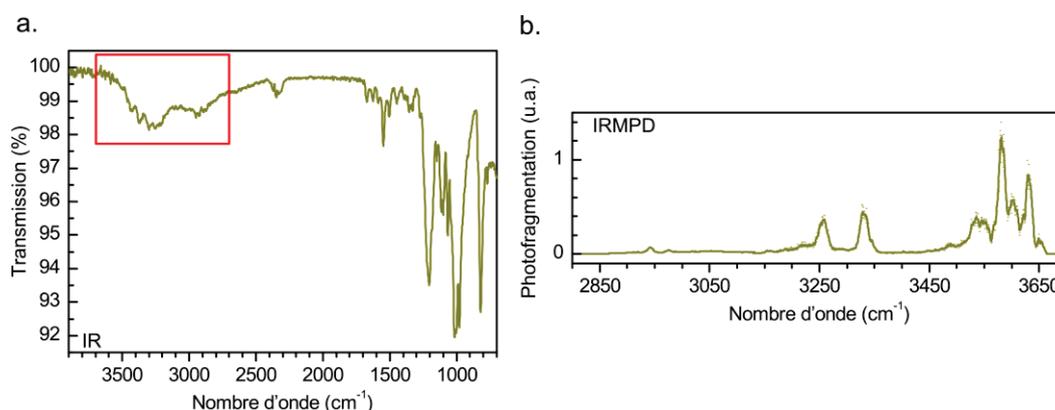


Figure 4 : Spectre IR de la glucosamine 6-sulfate en phase condensée (a) comparé au spectre IRMPD de la glucosamine 6-sulfate en phase gazeuse (b) dans la région 2800-3700 cm^{-1} accessible à l'aide d'un laser de table de type OPO infrarouge accordable.

2. Développements instrumentaux

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à repousser les limites actuelles de la spectroscopie IRMPD afin d'exploiter le potentiel analytique de cette méthode pour l'identification des carbohydrates. Pour cela, de nombreux développements instrumentaux ont été indispensables afin de diminuer le temps nécessaire à la réalisation d'un spectre IRMPD, d'obtenir une méthode utilisable sur de nombreux états de charge, d'explorer les informations obtenues sur une gamme spectrale étendue, 100-3700 cm^{-1} mais aussi de s'intéresser à l'implémentation de méthodes séparatives en vue d'analyser des mélanges complexes. Des développements théoriques ont également été réalisés en collaboration étroite avec

l'équipe de chimie théorique de l'Institut Lumière Matière et ont permis d'interpréter les spectres IRMPD réalisés en matière de conformation. De plus l'expérience acquise sur ces différents dispositifs expérimentaux a permis d'accueillir des collaborations nationales et internationales au sein du laboratoire.

2.1. Couplage LCQ/OPO

Le premier couplage fut réalisé à Lyon entre un laser OPO/OPA infrarouge Laservision et un spectromètre de masse composé d'une source électrospray et d'un piège à ion tridimensionnel de la société thermofinnigan (LCQ).

2.1.1. Dispositif expérimental

Le spectromètre de masse LCQ, représenté sur la figure 5, est composé d'une source électrospray qui a pour rôle de nébuliser la solution contenant les molécules d'intérêt et de les ioniser en appliquant une tension d'environ 4 kV à la pointe de la source électrospray. Cette solution est introduite dans la source à l'aide d'un pousse seringue au débit de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les ions vont être ensuite injectés dans le spectromètre de masse via un capillaire chauffant et guidés par une série d'optique ionique comprenant deux lentilles, un écorceur et deux octapôles jusqu'au piège à ions 3D. Les ions sont alors stockés au sein de ce piège dans un tampon d'hélium à l'aide de radiofréquences puis analysés et détectés. L'avantage d'un piège d'ions est qu'il est possible d'isoler une masse d'intérêt par éjection des autres ions en appliquant une rampe de tension au niveau des électrodes. Il est alors possible de fragmenter l'ion sélectionné (MS^2) soit par dissociation induite par collision (CID) soit par dissociation induite par laser (LID). Ses fragments peuvent être analysés ou l'un d'eux peut être isolé afin de réaliser une nouvelle étape de dissociation (MS^3). Il est possible de répéter ces différentes étapes plusieurs fois (MS^n) ce qui s'avère particulièrement intéressant pour le séquençage ou l'identification de composés inconnus.

Le système laser OPO, représenté sur la figure 5, est constitué d'un laser pulsé Nd:YAG de longueur d'onde 1064 nm cadencé à 10 Hz possédant une puissance de sortie d'environ 7,3 W et la durée des impulsions est d'environ 8 nanosecondes. Le faisceau laser est injecté dans le laser OPO à l'aide de deux miroirs (M1 et M2). Ensuite, ce faisceau est divisé en deux, la première partie pompe un doubleur de fréquence permettant d'obtenir une longueur d'onde de 532 nm qui servira de laser de pompe pour la cavité laser OPO, oscillateur paramétrique optique, constituée de deux cristaux. Celle-ci permet de produire selon l'angle d'incidence de ses cristaux des photons dans le proche infrarouge. Ce faisceau laser est enfin recombinaison avec la deuxième partie du bras à 1064 nm dans la partie OPA (amplificateur paramétrique optique) constituée de quatre cristaux qui permettent selon leur angle d'incidence

d'obtenir deux signaux. Le premier est accordable entre 710-885 nm et le second entre 1,35-5 μm . Ce laser est utilisé pour réaliser la spectroscopie IRMPD entre 2700 et 3700 cm^{-1} et la puissance moyenne dans cette région est de 0,12 W.

Ces deux dispositifs sont couplés afin de réaliser la spectroscopie IRMPD à l'intérieur du piège à ions tridimensionnel du spectromètre de masse. Pour cela, l'électrode centrale du piège ainsi que le spectromètre de masse ont été percés et une fenêtre transparente à l'infrarouge a été placée pour maintenir le vide dans le spectromètre de masse. Le faisceau laser est injecté dans le piège à l'aide de différents miroirs (M3 et M4) et un miroir parabolique (M5) est utilisé afin de focaliser le laser sur les ions stockés dans le piège. Enfin un obturateur mécanique est utilisé afin de synchroniser l'irradiation avec la période durant laquelle les ions sont isolés dans le piège.

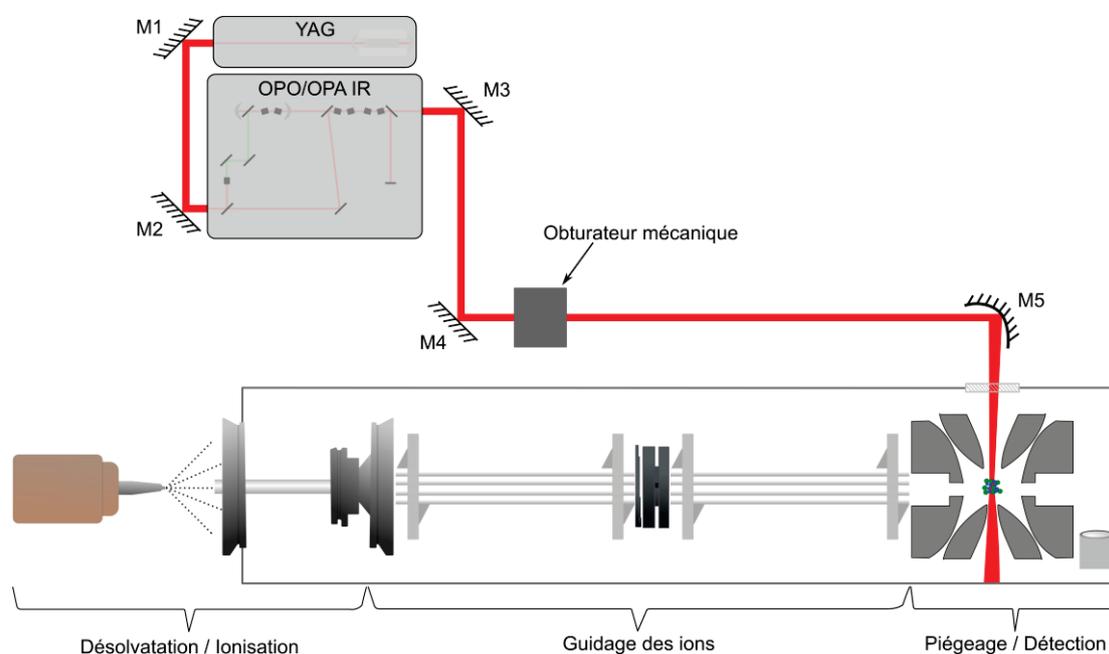


Figure 5 : Schéma du dispositif expérimental couplant le spectromètre de masse LCQ au laser OPO

2.1.2. Performances du dispositif expérimental

Ce dispositif expérimental est particulièrement performant et permet d'obtenir une photofragmentation efficace, et donc des spectres IRMPD sur une variété d'états de charge différents. En particulier, il est possible de réaliser des spectres IRMPD entre 2700 et 3700 cm^{-1} d'espèces avec un adduit métallique qui nécessitent un laser CO_2 supplémentaire pour assister la fragmentation.[28] Il est également possible d'étudier des espèces déprotonées qui sont connues pour être particulièrement difficiles à fragmenter à l'aide d'un laser OPO. En effet, c'est un état de charge peu étudié où la photofragmentation n'est pas observée[29] ou nécessite une durée d'irradiation importante.[30]

Pour illustrer les performances uniques du couplage instrumental réalisé dans le cadre de ma thèse, le spectre IRMPD de la sulfosérine déprotonée est représenté sur la figure 6a. Celui-ci a été réalisé avec 700 ms d'irradiation et une puissance laser atténuée de 5 dB. Ces conditions ont permis l'obtention d'un spectre IRMPD, contrairement à ce qui est observé dans la référence [29]. Ce spectre est caractérisé par l'absence de photofragmentation entre 3500 et 3700 cm^{-1} et la présence de quatre bandes observées à 2931, 3052, 3159 et 3316 cm^{-1} . Sur la figure 6b est représenté le spectre de photofragmentation de la sulfosérine déprotonée à 2931 cm^{-1} . Elle se fragmente de moitié à cette longueur d'onde et dans ces conditions expérimentales en perdant son sulfate chargé négativement.

Le couplage LCQ/OPO est un dispositif expérimental permettant à l'aide d'un seul montage et d'un seul laser de réaliser des spectres IRMPD de molécules de différents états de charge.

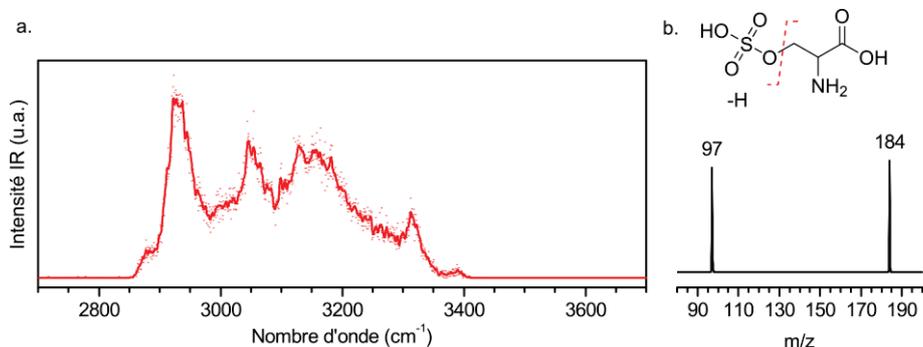


Figure 6 : Spectre IRMPD de la sulfosérine déprotonée (a) et son spectre de photofragmentation à 2931 cm^{-1} (b)

2.1.3. Temps d'analyse

Ces durées d'irradiation relativement courtes permettent la réalisation de spectres IRMPD en un temps réduit. Différentes vitesses de balayage ont donc été utilisées pour réaliser le spectre IRMPD de la *N*-acétyl glucosamine et les résultats sont présentés sur la figure 7. Dans le premier cas, la vitesse de balayage est de 0,2 cm^{-1}/s , la durée d'irradiation de 700 ms et chaque point est moyenné trois fois. Le second spectre est réalisé dans les mêmes conditions d'irradiation et de moyenne mais la vitesse de balayage a été augmentée à 1 cm^{-1}/s . Enfin, le dernier spectre IRMPD est réalisé dans des conditions très rapides d'analyse avec seulement 400 ms d'irradiation, une vitesse de balayage de 8 cm^{-1}/s et aucune moyenne. Ces trois spectres IRMPD sont similaires, et toutes les bandes sont observées aux mêmes positions. Toutefois, les détails obtenus dans le cas du spectre à 8 cm^{-1}/s sont moindres et la ligne de base est légèrement fluctuante. Ceci est probablement causé entre autres par l'absence de moyenne. Les deux autres spectres IRMPD sont quasi identiques excepté le détail fin des bandes qui reste faible dans le cas du spectre à 1 cm^{-1}/s , notamment sur celles observées à 3536 et 3583 cm^{-1} .

Ces résultats exploratoires montrent qu'il est possible d'obtenir un spectre IRMPD en quelques minutes tout en conservant une signature infrarouge exploitable pour identifier la molécule par

comparaison à une base de données de référence. Pour diminuer encore le temps d'analyse, il reste toutefois deux limitations majeures. La première provient du laser OPO qui est cadencé à 10 Hz, c'est-à-dire que pendant 100 ms, l'interaction entre les ions et le laser ne se fait que pendant 8 nanosecondes. Il y a donc beaucoup de temps mort dans l'analyse et le diminuer en augmentant le taux de répétition du laser réduirait considérablement la durée d'une analyse. Le second point provient du spectromètre de masse utilisé qui est peu sensible et nécessite d'injecter pendant plusieurs centaines de millisecondes les ions à l'intérieur du piège 3D avant de pouvoir les irradier. C'est le but du dispositif expérimental présenté par la suite qui couple le laser OPO avec un spectromètre de masse LTQ XL qui est plus sensible que le LCQ et qui permet de réduire ce temps d'injection à moins d'une milliseconde pour la plupart des échantillons.

Ces efforts vers une durée d'analyse toujours plus courte sont nécessaires en vue de démocratiser la spectroscopie IRMPD et la rendre utilisable en analyse et pour l'identification de produits inconnus en complément des méthodes de laboratoire déjà existantes.

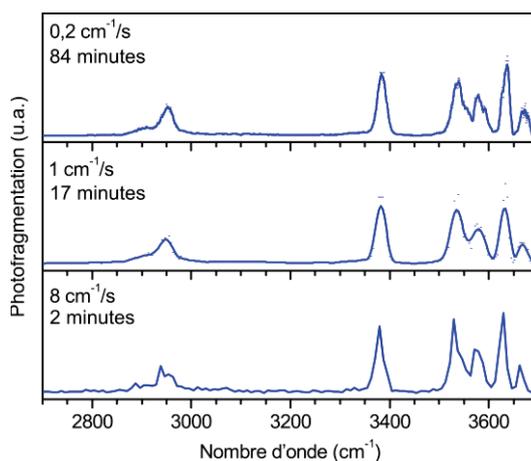


Figure 7 : Spectre IRMPD de la *N*-acétyl glucosamine entre 2700 et 3700 cm^{-1} pour différentes vitesses de balayage et de moyenne : 0,2 cm^{-1}/s et moyenné 3 fois, 1 cm^{-1}/s et moyenné 3 fois et enfin 8 cm^{-1}/s non moyenné. Ce dernier spectre est représenté en reliant les différents points expérimentaux.

2.1.4. Conditions typiques d'analyse

Sauf mention contraire, les spectres IRMPD présentés dans la suite du manuscrit sont réalisés par injection de l'échantillon via une seringue au débit de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$, l'ion d'intérêt est alors isolé puis irradié pendant une durée de 700 ms, chaque point est moyenné trois fois et l'intervalle spectral 2700-3700 cm^{-1} est balayé à une vitesse de 0,4 cm^{-1}/s . Dans ces conditions, un spectre IRMPD dans toute la région OPO est réalisé en environ 42 minutes. La puissance laser est généralement atténuée de 5 dB pour des espèces protonées et non atténuée pour les autres états de charge.

2.2. Couplage LTQ XL/OPO

2.2.1. Dispositif expérimental

Le spectromètre de masse LTQ XL, représenté sur la figure 8, est similaire au spectromètre de masse LCQ présenté précédemment mais possède une plus grande sensibilité. Il diffère du LCQ par la présence de deux quadripôles et d'un octapôle mais surtout d'un piège à ions linéaire qui permet le stockage d'un plus grand nombre de molécules en phase gazeuse. Ces ions sont donc plutôt dispersés dans l'axe du piège contrairement au cas du piège à ions 3D où le nuage d'ions est fortement localisé en son centre.

Pour ces raisons, les instruments dédiés à la spectroscopie IRMPD utilisant des lasers OPO sont plus généralement des pièges à ions 3D, puisqu'ils ont l'avantage de concentrer les ions au même endroit et donc de faciliter le recouvrement et la focalisation du faisceau infrarouge sur le nuage d'ions. En revanche, les outils couplant un spectromètre de masse avec un laser infrarouge utilisé pour la fragmentation et l'analyse sont plus généralement de type piège linéaire, puisqu'ils possèdent une plus grande sensibilité. Ces instruments peuvent être couplés à des lasers CO₂ de très forte puissance qui sont alors non focalisés afin d'obtenir le meilleur recouvrement entre le nuage d'ions et le faisceau laser. Sur le dispositif expérimental LTQ XL/OPO, le laser infrarouge de l'OPO est nécessairement focalisé afin de rendre possible l'IRMPD. L'arrière du spectromètre de masse est modifié afin de placer une fenêtre transparente aux longueurs d'onde utilisées et le faisceau est injecté dans le piège linéaire par son électrode arrière qui est percée afin de le laisser passer.

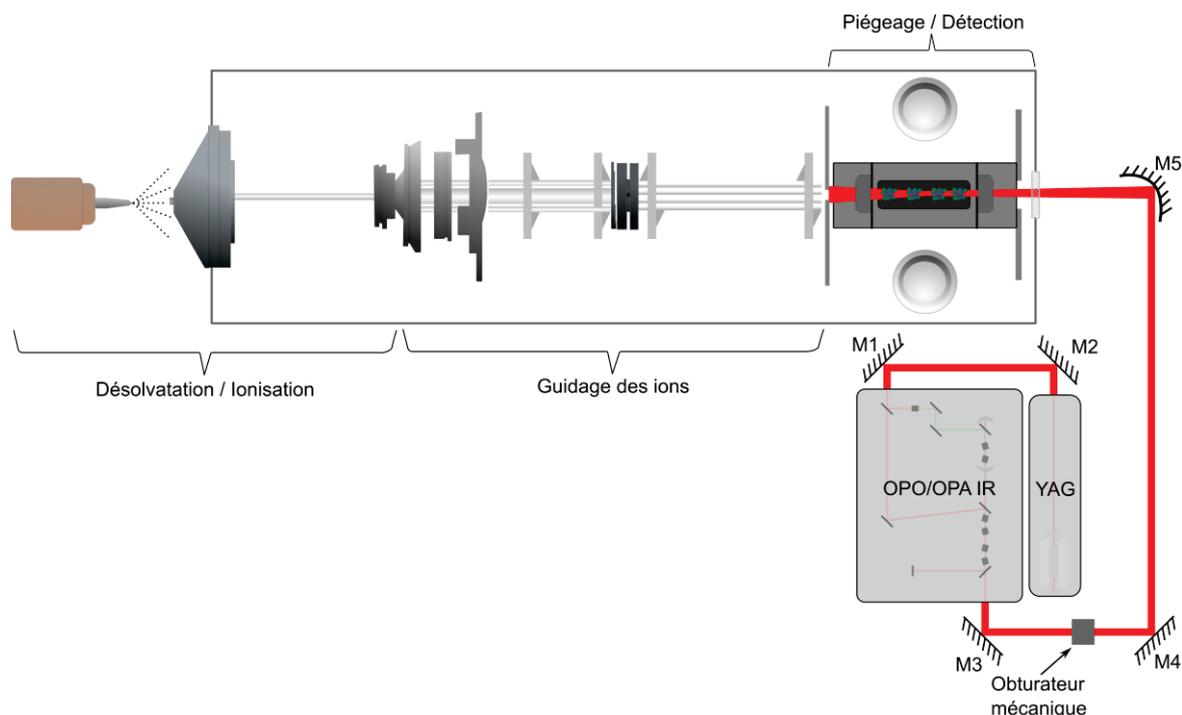


Figure 8 : schéma du dispositif expérimental couplant le spectromètre de masse LTQ XL avec le laser OPO

2.2.2. Comparaison des performances des couplages LTQ XL/OPO et LCQ/OPO

Afin de valider ce couplage, il est nécessaire de comparer les performances en termes de photofragmentation avec celles obtenues à l'aide du couplage du LCQ/OPO. Après optimisation du recouvrement entre le faisceau laser focalisé et le nuage d'ions à l'intérieur du piège linéaire du LTQ XL, un spectre IRMPD de la glucosamine entre 2700 et 3700 cm^{-1} a été réalisé et comparé sur la figure 9a avec le spectre obtenu avec le dispositif LCQ/OPO dans les mêmes conditions de laser. Les deux spectres IRMPD sont similaires et les bandes expérimentales sont observées aux mêmes positions.

En revanche, la structure fine des bandes est légèrement modifiée, les bandes sont plus intenses et plus larges dans le spectre IRMPD réalisé avec le LTQ XL, en effet dans ces conditions, il y a saturation de la photofragmentation. Le spectre de masse après irradiation à 3548 cm^{-1} obtenu sur les deux instruments est représenté sur la figure 9b. Dans le cas du LCQ, l'ion parent de $m/z = 180$ est majoritairement observé et les fragments de $m/z = 162$ et 144 sont observés en faible proportion. Par contre avec le LTQ XL, le fragment de $m/z = 162$ est majoritaire et un fragment supplémentaire de $m/z = 126$ est observé.

Ainsi, pour les mêmes conditions de laser, la photofragmentation est bien plus importante avec le couplage LTQ XL/OPO qu'avec le couplage LCQ/OPO. Dans ces conditions, il a été choisi pour la suite des spectres IRMPD de diminuer le temps d'irradiation à 400 ms et d'atténuer la puissance laser de 11 dB.

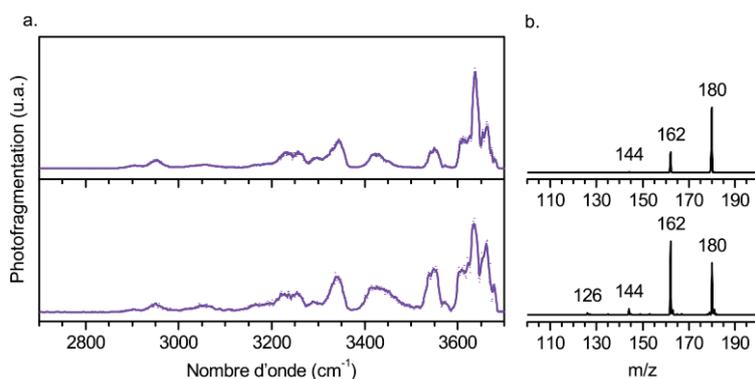


Figure 9 : Spectre IRMPD de la glucosamine entre 2700 et 3700 cm^{-1} (a) avec le couplage LCQ/OPO (haut) et avec le couplage LTQ XL/OPO (bas) et le spectre de photofragmentation correspondant obtenu à 3548 cm^{-1} (b)

2.2.3. Conditions HPLC/LTQ XL/OPO

Ce nouveau dispositif expérimental LTQ XL/OPO permet d'obtenir des spectres IRMPD entre 2700 et 3700 cm^{-1} en seulement 6,7 minutes tout en conservant une bonne résolution spectrale, grâce à sa meilleure sensibilité ainsi qu'à des temps d'injection des ions et d'irradiation diminués par rapport au couplage précédent. D'un autre côté l'équipe de méthodes séparatives de l'Institut des Sciences Analytiques a développé des conditions expérimentales permettant d'obtenir des pics chromatographiques de 7 minutes tout en conservant une séparation des différents carbohydrates présents dans un mélange. Cette collaboration a donné lieu à un couplage entre le dispositif expérimental LTQ XL/OPO et une chaîne chromatographique (Agilent 1290 infinity).

Dans le but de séparer des carbohydrates, le mode chromatographique HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography), a été sélectionné pour ses performances séparatives sur cette classe de biomolécules.[31] Une colonne (AdvanceBio Glycan Mapping column de Agilent®) de 2,1x100 mm de particules de silice greffées par des fonctions amide de 1,8 μm a été utilisée comme phase stationnaire. La phase mobile est constituée d'un mélange Acétonitrile/eau dont les proportions dépendent des composés étudiés et afin de conserver des pics chromatographiques larges, un mode isocratique est choisi. Un débit typique de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ est utilisé pour réaliser les séparations et celui-ci est diminué à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ lors de la réalisation du spectre IRMPD. Enfin, dans ces conditions, une analyse HPLC/MS/IR ne s'effectue qu'avec 10 μL d'une solution à 250 μM .

2.3. Couplage LCQ/LEL/OPO

Afin d'accéder à une gamme infrarouge différente de celle accessible grâce au laser OPO, il est nécessaire d'utiliser des lasers à électrons libres comme CLIO ou FELIX qui sont ouverts aux utilisateurs après soumission du projet scientifique. Dans cette optique, nous avons transporté le spectromètre de masse LCQ au centre laser FELIX à Nijmegen (Pays-Bas). Un nouveau montage optique a été réalisé afin

de pouvoir réaliser la spectroscopie IRMPD à l'aide de FELIX ou d'utiliser une combinaison d'un laser OPO et de FELIX afin de réaliser une expérience utilisant deux faisceaux lasers.

2.3.1. Dispositif expérimental

Le laser FELIX, schématiquement représenté sur la figure 10, est un laser à électrons libres constitué d'un canon à électrons, d'un accélérateur et d'une cavité optique à l'intérieur de laquelle se trouve un onduleur. Les électrons vont être produits par le canon puis accélérés à des énergies variant de 15 à 45 MeV et enfin injectés dans l'onduleur constitué d'une série d'aimants dont les pôles sont alternés. Les électrons vont alors osciller sous l'effet de ce champ électromagnétique et émettre des photons par rayonnement synchrotron. Le centre laser FELIX permet d'obtenir un faisceau infrarouge accordable entre 3 et 250 μm et fonctionne à une cadence de 5 ou 10 Hz.

Le couplage réalisé dans le but d'utiliser le laser FELIX est similaire à celui décrit précédemment ; il est constitué d'une série d'optiques (M1' et M2') permettant d'amener le faisceau IR sur un miroir parabolique (M5) servant à focaliser et injecter ce dernier au centre du piège à ions du spectromètre de masse LCQ. L'utilisation d'un laser OPO est également possible afin de réaliser des expériences nécessitant l'utilisation de deux longueurs d'onde différentes de façon simultanée. Pour cela, le chemin optique diffère du couplage LCQ/OPO seul, en sortie de laser, le faisceau est focalisé à l'aide d'un miroir parabolique et d'une lentille afin de compenser la divergence de celui-ci. Il est ensuite recombinaison avec le faisceau IR provenant de FELIX à l'aide d'un miroir demi-lune (M4) puis guidé jusqu'au miroir d'injection (M5). Un obturateur mécanique est placé sur chacun des chemins optiques afin de spécifiquement synchroniser l'irradiation IR de l'OPO ou de FELIX avec la présence des ions dans le piège 3D.

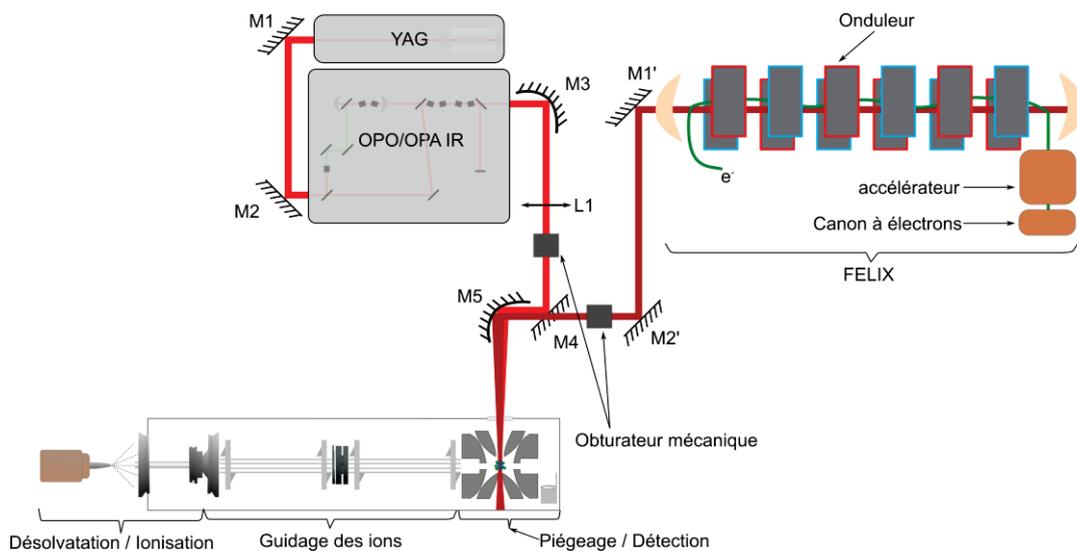


Figure 10 : Schéma du dispositif expérimental réalisé lors de la campagne de mesure au laser à électrons libres FELIX

2.3.2. Expériences LCQ/LEL

Les spectres IRMPD réalisés avec le couplage LCQ/FELIX sont obtenus dans des conditions similaires à celles décrites pour le dispositif expérimental LCQ/OPO. Seule la durée d'irradiation est diminuée à 400 ms afin d'éviter de saturer la photofragmentation des espèces piégées. La puissance du laser est également adaptée selon les espèces pour les mêmes raisons. Le laser FELIX est utilisé dans les expériences suivantes entre 5,5 et 100 μm ce qui correspond en nombre d'onde à un intervalle situé entre 1800 et 100 cm^{-1} . Pour la réalisation des spectres IRMPD en utilisant le laser FELIX, une vitesse de balayage moyenne de 25 nm/s est utilisée.

2.3.3. Expériences LCQ/OPO/LEL

Avec ce dispositif expérimental comprenant deux lasers, il est possible de réaliser des expériences où ils sont utilisés simultanément. C'est le cas de la spectroscopie d'extermination dont les résultats sont présentés dans le chapitre 4.

Cette méthode est particulièrement intéressante lorsque plusieurs formes de même masse sont présentes en phase gazeuse que ce soit des conformations ou des isomères différents. Le schéma spectroscopique utilisé est simple, l'un des lasers est placé à une longueur d'onde d'absorption spécifique d'une de ces formes afin de la photofragmenter totalement. Ensuite après irradiation, le second laser est utilisé pour réaliser le spectre IRMPD des espèces restantes en phase gazeuse de façon similaire au schéma à un seul laser. Avec le couplage LCQ/FELIX/OPO, deux schémas spectroscopiques ont été utilisés : irradiation pendant 600 ms avec FELIX puis réalisation du spectre IRMPD en irradiant pendant 1200 ms avec l'OPO. Il est également possible de réaliser le schéma inverse, à savoir photofragmenter avec l'OPO pendant 1200 ms puis irradier pendant 400 ms avec FELIX afin de réaliser la spectroscopie infrarouge.

2.4. Support théorique aux expériences

Pour attribuer une conformation en phase gazeuse, une comparaison entre le spectre expérimental IRMPD et des spectres infrarouges théoriques est nécessaire. Lors de cette thèse, une collaboration étroite avec l'équipe de chimie théorique de l'Institut Lumière Matière s'est instaurée dans le but d'interpréter les spectres IRMPD réalisés sur les différents dispositifs expérimentaux présentés précédemment et ainsi d'identifier les structures observées en phase gazeuse. Pour cela, Loïc Barnes a réalisé les calculs théoriques permettant l'attribution de structures et développé de nouvelles méthodes théoriques originales dans le cadre de sa thèse. Dans ce manuscrit et sauf mention contraire, les calculs présentés sont réalisés selon le protocole suivant. Tout d'abord, une dynamique moléculaire est réalisée en utilisant le champ de force semi-empirique PM7[32] et plusieurs milliers de géométries

obtenues au cours de celle-ci sont sélectionnées. Celles-ci sont optimisées par PM7 et les doublons sont ensuite éliminés. Les géométries restantes sont optimisées par DFT B3LYP/6-31G* à l'aide de Gaussian09,[33] et une nouvelle étape de suppression des doublons est réalisée. Enfin une dernière optimisation de la géométrie est effectuée par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd), les doublons obtenus sont éliminés et le spectre infrarouge théorique est ensuite calculé par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd) pour chacune des géométries restantes.

Ce protocole pour la réalisation des calculs théoriques effectués par l'équipe de chimie théorique de l'ILM a été développé en prenant en compte les habitudes théoriques de la communauté de spectroscopie de biomolécules en phase gazeuse, puis a été testé et validé sur des molécules parfaitement connues afin d'optimiser la rapidité et la précision des calculs pour l'étude de petits carbohydrates.

2.5. Ouverture à la communauté scientifique

Les performances obtenues sur les couplages présentés précédemment sont très attractives vis-à-vis de la communauté internationale, ce qui a entraîné la mise en place de nombreuses collaborations. Environ 15 % du temps disponible des instruments est dédié à l'accueil et la collaboration avec des utilisateurs extérieurs comme notamment Perdita Barran et Sabine Flitsch (University of Manchester), Anouk Rijs (Radboud university Nijmegen), Mary Rodgers (Wayne State University), Rob Dunbar (Case western reserve university), Nick Polfer (University of Florida), Bruno Moerschbacher (University of Münster).

3. Illustration du potentiel analytique de l'IRMPD pour la différenciation de molécules isobariques

3.1. Glucosamine 6-sulfate et glucosamine 6-phosphate

Sous forme protonée, la glucosamine 6-sulfate et la glucosamine 6-phosphate ont respectivement pour masse exacte 260,0535 et 260,0440 uma, soit une différence de masse de 0.0095 uma. Pour les différencier en spectrométrie de masse, il est nécessaire d'avoir un pouvoir de résolution d'au moins 28 000. Dans le cas d'oligosaccharides contenant ces modifications, l'utilisation d'un spectromètre de masse d'ultra haute résolution est nécessaire.[34] Il est en revanche impossible de différencier ces deux oses avec des instruments classiques de spectrométrie de masse comme le piège d'ions ou l'analyseur quadripolaire puisque leur pouvoir de résolution est d'environ 2 000. Des méthodes basées sur les différences de comportement lors de complexations ont été développées[35,36] pour contourner cette limitation mais ne sont pas transposables à d'autres molécules. La spectrométrie de masse couplée à la spectroscopie infrarouge a permis d'identifier la nature de la modification, sulfate

ou phosphate, dans le cas de peptides[37] ce qui semble la désigner comme une méthode analytique également intéressante pour l'identification de la modification fonctionnelle dans le cas des oses.

La glucosamine 6-sulfate et la glucosamine 6-phosphate possèdent la même masse et forment le même fragment par les méthodes de fragmentation de spectrométrie de masse. Leur spectre MS/MS est représenté en figure 11a, l'ion parent est obtenu à $m/z = 260$ dans les deux cas et forme le même fragment à $m/z = 242$ par perte de 18 uma soit une molécule d'eau. En revanche, leur spectre IRMPD entre 2800 et 3700 cm^{-1} , représenté en figure 11b, est clairement différent. Ces spectres sont composés de trois régions, la première autour de 2900 cm^{-1} qui correspond aux modes d'élongation C-H, la seconde vers 3300 cm^{-1} correspondant aux modes d'élongation d'une amine protonée et enfin la dernière au-dessus de 3500 cm^{-1} contient les modes d'élongation des hydroxyles.

Le spectre IRMPD de la glucosamine 6-phosphate est caractérisé par une bande très intense à 3664 cm^{-1} alors que celui de la glucosamine 6-sulfate est composé d'une région active entre 3500 et 3660 cm^{-1} avec un maximum d'intensité à 3582 cm^{-1} . Le couplage de la spectrométrie de masse à la spectroscopie infrarouge permet donc d'identifier facilement la nature de la modification, sulfate ou phosphate, pour la glucosamine.

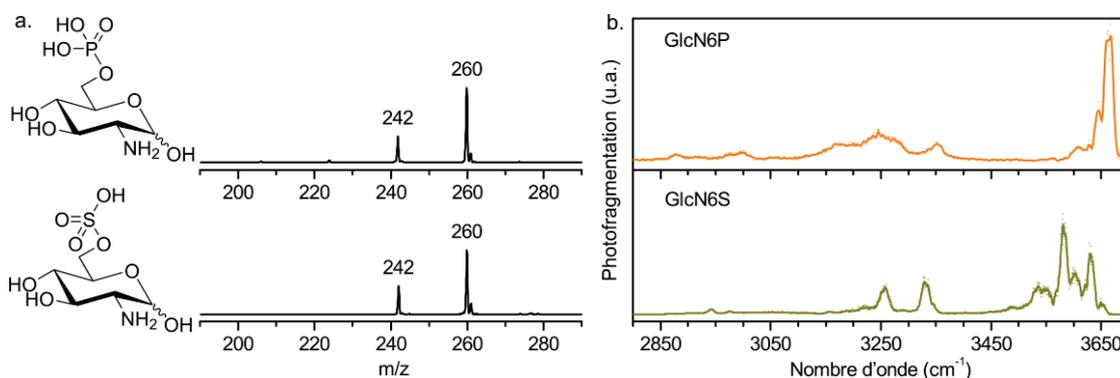


Figure 11 : Spectre MS/MS de la glucosamine 6-phosphate et de la glucosamine 6-sulfate (a) et leur spectre IRMPD respectif (b).

3.2. La nature de la modification

Pour identifier les différentes bandes observées sur le spectre IRMPD, il est nécessaire de le comparer avec des spectres IR calculés grâce à différents outils théoriques. Pour cela, il convient d'identifier la forme adoptée par l'ose en phase gazeuse. Par exemple, le glucose en solution est majoritairement sous forme pyranose (la forme furanose est fortement minoritaire et n'a donc pas été considérée dans cet exemple). Il est également en équilibre tautomérique entre sa forme anomérique α et sa forme β en passant par sa forme linéaire. En phase gazeuse celui-ci peut donc se retrouver soit sous forme pyranose, soit sous forme linéaire et dans le cas de sucres déprotonés, leur spectre IRMPD montre une

bande d'élongation C=O observée autour de 1700 cm^{-1} indiquant que ceux-ci sont sous forme linéaire.[12]

Le spectre IRMPD de la glucosamine 6-phosphate entre 800 et 1800 cm^{-1} obtenu au laser à électrons libres FELIX est représenté sur la figure 12. Ce spectre est composé de deux régions : la première est constituée de nombreuses bandes entre 900 et 1300 cm^{-1} et la seconde est uniquement constituée d'une bande observée à 1441 cm^{-1} . Le spectre ne présente pas de bande d'absorption autour de 1700 cm^{-1} ce qui est en faveur d'une forme cyclique de la glucosamine 6-phosphate à l'intérieur du piège à ions.

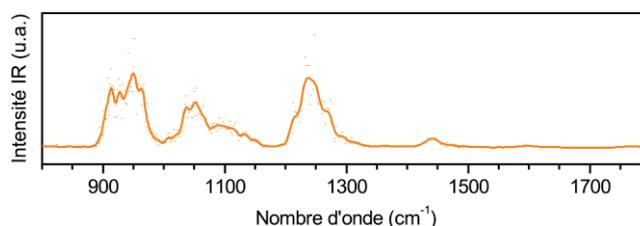


Figure 12 : Spectre IRMPD de la glucosamine 6-phosphate entre 800 et 1800 cm^{-1}

Dans le spectromètre de masse, la glucosamine 6-phosphate est présente sous forme cyclique et le motif observé autour de 3300 cm^{-1} suggère une protonation de la molécule au niveau de l'amine en position 2. À partir de ces informations et pour les deux anomères, une recherche conformationnelle a été réalisée par le Professeur Allouche selon un protocole similaire à celui décrit précédemment mais la dernière étape d'optimisation et de calcul du spectre IR a été réalisée avec B3LYP/6-311+G*.

Afin d'observer la robustesse des résultats précédents, la position des modes d'élongation OH de la fonction phosphate et le mode d'élongation OH de la fonction sulfate est extraite pour chacune des conformations obtenues en dessous de 25 kJ/mol et représentée sur la figure 13. Les modes d'élongation OH de la fonction phosphate sont retrouvés entre 3640 et 3680 cm^{-1} alors que les modes d'élongation OH de la fonction sulfate sont observés entre 3570 et 3600 cm^{-1} .

Quelque soit la conformation adoptée par les oses, la bande OH du sulfate et les bandes OH du phosphate se trouvent à des gammes d'énergie différentes et permettent d'identifier facilement la nature de la modification du sucre. Ces signatures robustes permettent d'envisager le couplage de la spectrométrie de masse à la spectroscopie infrarouge comme une méthode d'analyse performante pour la différenciation des sucres sulfatés ou phosphatés.

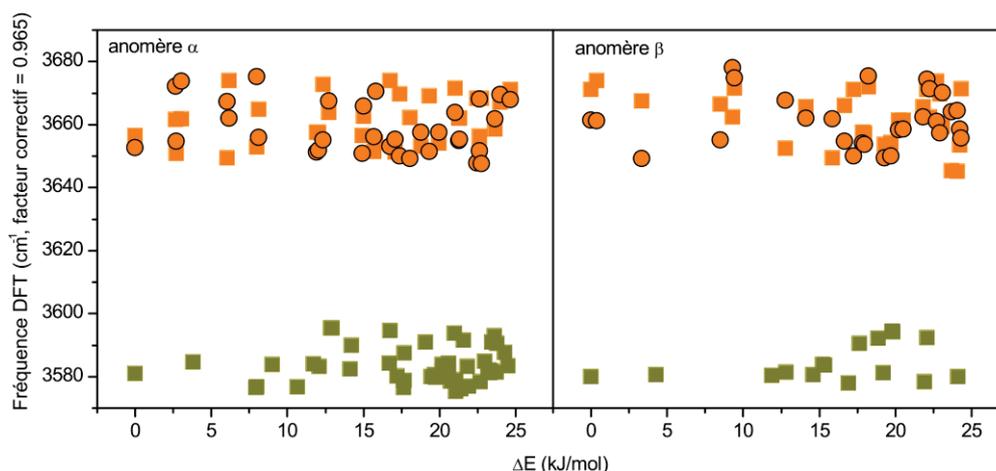


Figure 13 : Fréquences théoriques des modes d'élongation des deux hydroxyles de la fonction phosphate (rond et carré orange) et de l'hydroxyle de la fonction sulfate (vert) calculées par DFT B3LYP/6-311+G* pour toutes les conformations obtenues jusque 25kJ/mol lors de la recherche conformationnelle

3.3. Liaison hydrogène, structure, comparaison expérience / théorie

L'étude théorique sur toutes les conformations en-dessous de 25 kJ/mol a montré que la position des modes d'élongation OH de la fonction phosphate varie peu selon la conformation adoptée par la molécule. Cela permet d'obtenir une signature robuste de la présence d'un phosphate, mais ne permet pas d'obtenir des informations structurales fines sur la glucosamine 6-phosphate.

Pour vérifier la sensibilité des autres modes d'élongation X-H à la conformation, le spectre IRMPD de la glucosamine 6-phosphate est comparé aux spectres IR théoriques de différentes conformations obtenues lors de la recherche conformationnelle et représentatives des structures observées en-dessous de 25 kJ/mol. Cinq conformations de l'anomère α ont été sélectionnées et représentées en figure 14 : une chaise 4C_1 avec une interaction entre l'hydroxyle en position 4 et l'oxygène de la fonction phosphate qui est la conformation de plus basse énergie, une chaise 4C_1 avec une interaction entre l'hydroxyle en position 1 et l'oxygène de la fonction phosphate, une chaise 4C_1 sans interaction, une chaise 1C_4 avec une interaction entre l'hydroxyle en position 3 et l'oxygène de la fonction phosphate et enfin un bateau 3_0B avec une interaction entre l'hydroxyle en position 4 et l'oxygène de la fonction phosphate.

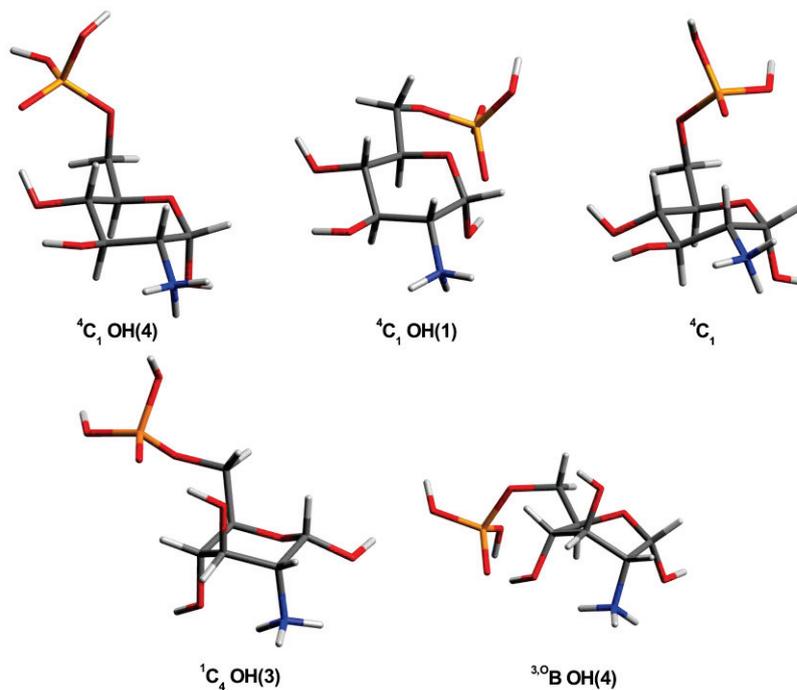


Figure 14 : Conformations de l'anomère α de la glucosamine 6-phosphate obtenues après la recherche conformationnelle : une chaise 4C_1 avec une interaction entre l'hydroxyle en position 4 et l'oxygène de la fonction phosphate, une chaise 4C_1 avec une interaction entre l'hydroxyle en position 1 et l'oxygène de la fonction phosphate, une chaise 4C_1 sans interaction, une chaise 1C_4 avec une interaction entre l'hydroxyle en position 3 et l'oxygène de la fonction phosphate et enfin un bateau ${}^{3,0}B$ avec une interaction entre l'hydroxyle en position 4 et l'oxygène de la fonction phosphate.

Les spectres IR peuvent être découpés en trois régions distinctes, entre 2800 et 3100 cm^{-1} où sont observés les modes d'élongation C-H ; entre 3100 et 3500 cm^{-1} où se trouvent les modes d'élongation N-H et les modes d'élongation des O-H impliqués dans des liaisons hydrogènes ; enfin au-dessus de 3500 cm^{-1} se trouvent les modes d'élongation des O-H coordonnés ou libres.

Le spectre IR théorique de chacune des conformations sélectionnées est représenté en figure 15 et comparé au spectre IRMPD de la glucosamine 6-phosphate. La première région, entre 2800 et 3100 cm^{-1} , est composée pour chacun des spectres IR théorique de nombreuses bandes étalées entre 2900 et 3050 cm^{-1} . Sur le spectre IRMPD, trois bandes sont observées à 2880, 2920 et 2990 cm^{-1} . Du fait des nombreux modes d'élongation C-H et de leur dispersion sur la région, il est difficile d'attribuer une conformation au spectre expérimental en utilisant cette gamme de nombre d'onde.

Dans la seconde région, entre 3100 et 3500 cm^{-1} , un même motif N-H est observé pour les conformations de type chaise 4C_1 , à savoir trois modes espacés d'environ 65 cm^{-1} et observés vers 3250, 3318 et 3383 cm^{-1} . Le motif N-H est plus espacé pour la conformation de type chaise 1C_4 avec des modes observés à 3113, 3283 et 3398 cm^{-1} et encore plus espacé dans le cas du bateau ${}^{3,0}B$ avec des modes N-H à 2875, 3275 et 3402 cm^{-1} . Cet espacement important des modes N-H dans le cas de la conformation chaise 1C_4 ou bateau ${}^{3,0}B$ peut s'expliquer par une proximité plus importante des

hydroxyles adjacents. En effet, moins il y a d'interactions, plus les modes sont libres et donc resserrés et retrouvés à plus haute énergie comme dans la conformation chaise 4C_1 . Le spectre expérimental est lui composé de trois bandes asymétriques observées à 3175, 3250, 3350 cm^{-1} formant un motif large. En se basant sur le motif des modes N-H, la conformation de cycle de type chaise 4C_1 est celle qui correspond le plus à l'expérience, en effet, le motif entre 3100 et 3400 cm^{-1} comprend au moins trois bandes resserrées autour de 3250 cm^{-1} , ce qui n'est pas le cas pour les conformations de type 1C_4 ou ${}^{3,0}B$.

Dans cette même région peuvent se trouver les modes O-H impliqués dans des liaisons hydrogènes. La conformation de cycle chaise 4C_1 possède un mode O-H lié à 3388 cm^{-1} lorsque l'hydroxyle en position 4 est en interaction avec le phosphate et à 3228 cm^{-1} lorsque c'est l'hydroxyle en position 1. Ces modes liés sont théoriquement très intenses et leur position dépend de la force de cette liaison hydrogène et donc de la conformation. Toutefois, expérimentalement, plus un mode est lié, plus celui-ci va se retrouver étalé et donc de plus faible intensité. Dans notre cas, le mode est alors noyé dans le motif N-H et ne permet pas d'attribuer le spectre IRMPD à l'une des conformations de type 4C_1 .

Enfin, la dernière région, au-dessus de 3500 cm^{-1} comprend les modes O-H libres ou légèrement coordonnés. Pour la conformation 4C_1 OH(4), un mode est observé à 3616 cm^{-1} et les trois autres modes O-H sont regroupés autour de 3657 cm^{-1} . Dans le cas de la conformation 4C_1 OH(1), un mode est observé à 3632 cm^{-1} , le second à 3653 cm^{-1} et enfin les deux restants à 3675 cm^{-1} . Enfin, la dernière conformation 4C_1 sans interaction possède trois bandes autour de 3645 cm^{-1} et deux vers 3672 cm^{-1} . Le spectre IRMPD est lui composé d'une bande à 3610 cm^{-1} et d'une bande très intense à 3664 cm^{-1} possédant un épaulement à 3644 cm^{-1} . Seule la conformation 4C_1 OH(4) possède un motif similaire, en effet, pour les autres conformations les modes sont légèrement décalés vers les plus hautes énergies.

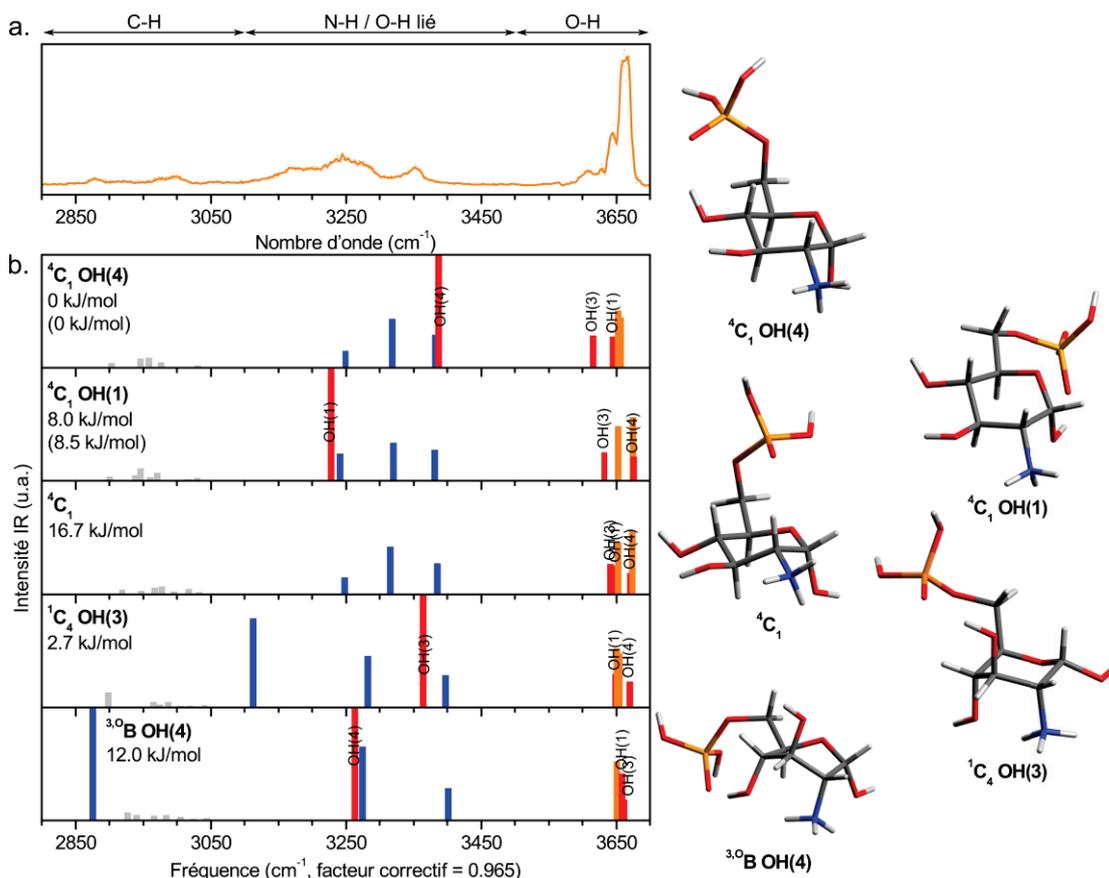


Figure 15 : Spectre IRMPD de la glucosamine 6-phosphate comparé à différents spectres IR théorique obtenus par DFT B3LYP/6311+G*. Un facteur correctif de 0,965 a été utilisé et un code couleur est attribué pour identifier les différents modes d'élongation : en gris sont représentés les modes CH, en bleu les modes NH, en orange les modes OH de la fonction phosphate et en rouge les modes OH du cycle osidique.

Il est à noter que le motif N-H est très large expérimentalement et faiblement résolu, ceci peut s'expliquer par le mode O-H lié qui vient perturber le motif ou par l'existence d'une autre forme présente en phase gazeuse. En effet, l'attribution entre la théorie et l'expérience a été réalisée uniquement en prenant en compte l'anomère α or l'anomère β est normalement présent également en phase gazeuse.

Pour vérifier cela, les spectres IR théoriques des anomères α et β de la glucosamine 6-phosphate de conformation 4C_1 OH(4) sont représentés en figure 16. Pour l'anomère β , le motif des modes N-H est bien resserré, ce qui est caractéristique d'une conformation 4C_1 . Par contre, le motif est plus compact et les modes à 3278, 3353 et 3373 cm^{-1} sont contenus dans le motif formé par les N-H de l'anomère α . Cette modification du motif N-H en fonction de l'anomère peut s'expliquer par la proximité entre l'amine en position 2 et l'hydroxyle anomérique en position 1 : celui-ci est en position axiale pour la forme α de conformation 4C_1 , alors qu'il est en position équatoriale pour la forme β ce qui entraîne moins d'interactions avec l'amine également en position équatoriale.

Les spectres IR des anomères α et β de la glucosamine 6-phosphate sont différents pour une même conformation, et le motif N-H formé par un mélange des anomères reste compatible avec le motif observé expérimentalement. Par contre, il est impossible de discerner à partir du spectre IRMPD une bande spécifique de l'un des anomères.

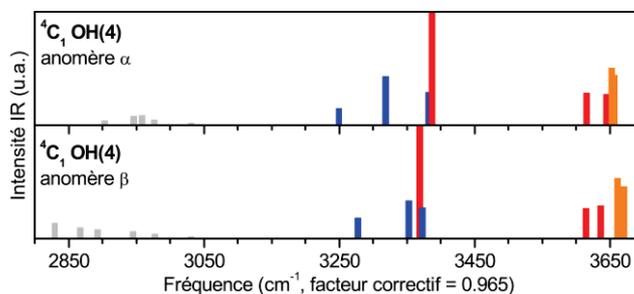


Figure 16 : Spectres IR théoriques obtenus par DFT B3LYP/6311+G* des anomères α (haut) et β (bas) de la glucosamine 6-phosphate pour la même conformation, une chaise 4C_1 . Un facteur correctif de 0,965 a été utilisé et un code couleur est attribué pour identifier les différents modes d'élongation : en gris sont représentés les modes CH, en bleu les modes NH, en orange le mode OH de la fonction phosphate et en rouge les modes OH du cycle osidique.

3.4. Conclusion

Pour conclure, bien qu'ayant le même rapport m/z et les mêmes fragments, il est possible de différencier la glucosamine 6-sulfate de la glucosamine 6-phosphate grâce à leur spectre IRMPD. De plus, il a été montré que les hydroxyles portés par la modification fonctionnelle possèdent une signature robuste et spécifique l'une de l'autre : une bande autour de 3660 cm^{-1} dans le cas d'une fonction phosphate et vers 3580 cm^{-1} pour une fonction sulfate. Il est donc possible d'identifier la nature d'une modification fonctionnelle grâce au couplage de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie infrarouge.

Il est également possible d'attribuer une conformation par comparaison avec la théorie, car le spectre IR dépend de la conformation adoptée par l'ose. La région des modes d'élongation des C-H est difficile à interpréter, par contre, la position des modes N-H est spécifique de la conformation du cycle osidique alors que celle des modes O-H dépend des interactions intramoléculaires spécifiques de chaque conformation.

L'absence de bande d'élongation C=O dans la région 800-1800 cm^{-1} est en faveur d'une forme cyclique de l'ose, ce qui a été confirmé en comparant le spectre IRMPD et les spectres IR théoriques de différentes conformations dans la région 2800-3700 cm^{-1} . Cette comparaison a permis d'identifier le spectre expérimental comme étant un mélange des anomères α et β ayant pour conformation une chaise 4C_1 possédant une liaison intramoléculaire entre l'hydroxyle en position 4 et l'oxygène de la fonction phosphate.

La finesse des informations structurales obtenues conforte l'utilisation du couplage de la spectrométrie de masse à la spectroscopie infrarouge pour l'identification de molécules isomériques comme les carbohydrates.

4. Bibliographie

1. Bensimon, M.; Rapin, J.; Gäumann, T. Comparison of infrared photodissociation in a Fourier transform mass spectrometer with metastable ion decay in a double-focusing mass spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1986**, *72*, 125–135.
2. Oomens, J.; von Helden, G.; Meijer, G. Infrared Spectroscopy of Ionic PAHs and Related Compounds. In *The Dense Interstellar Medium in Galaxies*; Pfalzner, S.; Kramer, C.; Straubmeier, C.; Heithausen, A., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1997; Vol. 91, pp. 545–548.
3. Kapota, C.; Lemaire, J.; Maître, P.; Ohanessian, G. Vibrational Signature of Charge Solvation vs Salt Bridge Isomers of Sodiated Amino Acids in the Gas Phase. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1836–1842.
4. Polfer, N. C.; Oomens, J.; Dunbar, R. C. IRMPD spectroscopy of metal-ion/tryptophan complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 2744.
5. Oh, H.; Breuker, K.; Sze, S. K.; Ge, Y.; Carpenter, B. K.; McLafferty, F. W. Secondary and tertiary structures of gaseous protein ions characterized by electron capture dissociation mass spectrometry and photofragment spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 15863–15868.
6. Bush, M. F.; O'Brien, J. T.; Prell, J. S.; Saykally, R. J.; Williams, E. R. Infrared Spectroscopy of Cationized Arginine in the Gas Phase: Direct Evidence for the Transition from Nonzwitterionic to Zwitterionic Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1612–1622.
7. Polfer, N. C.; Oomens, J.; Suhai, S.; Paizs, B. Spectroscopic and Theoretical Evidence for Oxazolone Ring Formation in Collision-Induced Dissociation of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17154–17155.
8. Polfer, N. C.; Oomens, J. Reaction products in mass spectrometry elucidated with infrared spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 3804.
9. Bythell, B. J.; Maître, P.; Paizs, B. Cyclization and Rearrangement Reactions of a_n Fragment Ions of Protonated Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14766–14779.
10. Stefan, S. E.; Eyler, J. R. Differentiation of Methyl-glucopyranoside Anomers by Infrared Multiple Photon Dissociation with a Tunable CO₂ Laser. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1224–1227.
11. Polfer, N. C.; Valle, J. J.; Moore, D. T.; Oomens, J.; Eyler, J. R.; Bendiak, B. Differentiation of Isomers by Wavelength-Tunable Infrared Multiple-Photon Dissociation-Mass Spectrometry: Application to Glucose-Containing Disaccharides. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 670–679.
12. Brown, D. J.; Stefan, S. E.; Berden, G.; Steill, J. D.; Oomens, J.; Eyler, J. R.; Bendiak, B. Direct evidence for the ring opening of monosaccharide anions in the gas phase: photodissociation of aldohexoses and aldohexoses derived from disaccharides using variable-wavelength infrared irradiation in the carbonyl stretch region. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 2469–2481.
13. Contreras, C. S.; Polfer, N. C.; Oomens, J.; Steill, J. D.; Bendiak, B.; Eyler, J. R. On the path to glycan conformer identification: Gas-phase study of the anomers of methyl glycosides of N-acetyl-d-glucosamine and N-acetyl-d-galactosamine. *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, *330–332*, 285–294.
14. Gloaguen, E.; Mons, M. Isolated Neutral Peptides. In *Gas-Phase IR Spectroscopy and Structure of Biological Molecules*; Rijs, A. M.; Oomens, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2014; Vol. 364, pp. 225–270.
15. Jockusch, R. A.; Kroemer, R. T.; Talbot, F. O.; Snoek, L. C.; Çarçabal, P.; Simons, J. P.; Havenith, M.; Bakker, J. M.; Compagnon, I.; Meijer, G.; von Helden, G. Probing the Glycosidic Linkage: UV and IR Ion-Dip Spectroscopy of a Lactoside. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5709–5714.
16. Talbot, F. O.; Simons, J. P. Sugars in the gas phase: the spectroscopy and structure of jet-cooled phenyl β -D-glucopyranoside. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 3562–3565.
17. Simons, J. P. Good vibrations: probing biomolecular structure and interactions through spectroscopy in the gas phase. *Mol. Phys.* **2009**, *107*, 2435–2458.
18. Cocinero, E. J.; Carcabal, P.; Vaden, T. D.; Simons, J. P.; Davis, B. G. Sensing the anomeric effect in a solvent-free environment. *Nature* **2011**, *469*, 76–79.
19. Polfer, N. C.; Oomens, J. Vibrational spectroscopy of bare and solvated ionic complexes of biological relevance. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 468–494.

20. Polfer, N. C. Infrared multiple photon dissociation spectroscopy of trapped ions. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2211.
21. Stedwell, C. N.; Galindo, J. F.; Roitberg, A. E.; Polfer, N. C. Structures of Biomolecular Ions in the Gas Phase Probed by Infrared Light Sources. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2013**, *6*, 267–285.
22. Oepts, D.; van der Meer, A. F. G.; van Amersfoort, P. W. The Free-Electron-Laser user facility FELIX. *Infrared Phys. Technol.* **1995**, *36*, 297–308.
23. Prazeres, R.; Berset, J. M.; Chaput, R.; Glotin, F.; Jaroszynski, D. A.; Ortega, J. M. CLIO, an infrared free electron laser facility. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* **1994**, *89*, 54–59.
24. Wight, C. A.; Beauchamp, J. L. Infrared spectra of gas-phase ions and their use in elucidating reaction mechanisms. Identification of C₇H₇⁺ structural isomers by multiphoton electron detachment using a low-power infrared laser. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6499–6501.
25. Dongre, A. R.; Jones, J. L.; Somogyi, Á.; Wysocki, V. H. Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: Evidence for the mobile proton model. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8365–8374.
26. Wysocki, V. H.; Tsaprailis, G.; Smith, L. L.; Breci, L. A. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 1399–1406.
27. Polfer, N. C.; Oomens, J.; Suhai, S.; Paizs, B. Infrared Spectroscopy and Theoretical Studies on Gas-Phase Protonated Leu-enkephalin and Its Fragments: Direct Experimental Evidence for the Mobile Proton. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5887–5897.
28. Sinha, R. K.; Nicol, E.; Steinmetz, V.; Maître, P. Gas phase structure of micro-hydrated [Mn(ClO₄)₂]⁺ and [Mn₂(ClO₄)₃]⁺ ions probed by infrared spectroscopy. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 758–772.
29. Paciotti, R.; Coletti, C.; Re, N.; Scuderi, D.; Chiavarino, B.; Fornarini, S.; Crestoni, M. E. Serine O-sulfation probed by IRMPD spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 25891–25904.
30. Almasian, M.; Grzetic, J.; van Maurik, J.; Steill, J. D.; Berden, G.; Ingemann, S.; Buma, W. J.; Oomens, J. Non-Equilibrium Isomer Distribution of the Gas-Phase Photoactive Yellow Protein Chromophore. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 2259–2263.
31. Alpert, A. J.; Shukla, M.; Shukla, A. K.; Zieske, L. R.; Yuen, S. W.; Ferguson, M. A. J.; Mehlert, A.; Pauly, M.; Orlando, R. Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates. *J. Chromatogr. A* **1994**, *676*, 191–202.
32. Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J. Mol. Model.* **2013**, *19*, 1–32.
33. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2009.
34. Bossio, R. E.; Marshall, A. G. Baseline Resolution of Isobaric Phosphorylated and Sulfated Peptides and Nucleotides by Electrospray Ionization FTICR MS: Another Step toward Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1674–1679.
35. Zhang, Y.; Go, E. P.; Jiang, H.; Desaire, H. A novel mass spectrometric method to distinguish isobaric monosaccharides that are phosphorylated or sulfated using ion-pairing reagents. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1827–1839.

36. Zhang, Y.; Jiang, H.; Go, E. P.; Desaire, H. Distinguishing phosphorylation and sulfation in carbohydrates and glycoproteins using ion-pairing and mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 1282–1288.
37. Patrick, A. L.; Stedwell, C. N.; Polfer, N. C. Differentiating Sulfopeptide and Phosphopeptide Ions via Resonant Infrared Photodissociation. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5547–5552.

Chapitre II

Séquençage de Carbohydrates par couplage MS/IR

Faits marquants

Validation de la métrique infrarouge dans la région des 3 μm pour différencier des isomères (page 58)

Conservation de la mémoire anomérique après fragmentation (page 70)

Mise en place d'une méthode de séquençage par MS/IR (page 75)

Comme discuté dans l'introduction, l'observable mesurée en spectrométrie de masse (m/z), ne permet pas de différencier les nombreux isomères présents dans les carbohydrates et seulement l'appartenance à l'une des grandes familles de modifications, *N*-acétyl hexosamines, hexosamines, desoxy-hexoses, acides hexuroniques peut être déterminée grâce à la masse. De plus, la deuxième observable qui peut être obtenue par spectrométrie de masse, la fragmentation, n'est pas spécifique de la nature de l'isomère, comme le montre la figure 17 où les spectres MS/MS de la *N*-acétyl glucosamine, *N*-acétyl galactosamine et *N*-acétyl mannosamine, sont représentés. Les fragments observés sont les mêmes pour ces trois isomères, des pertes successives d'eau, et seul les rapports d'intensité diffèrent légèrement. Ces fragments ne sont pas spécifiques ce qui limite l'identification de la nature de la molécule grâce à la spectrométrie de masse seule.

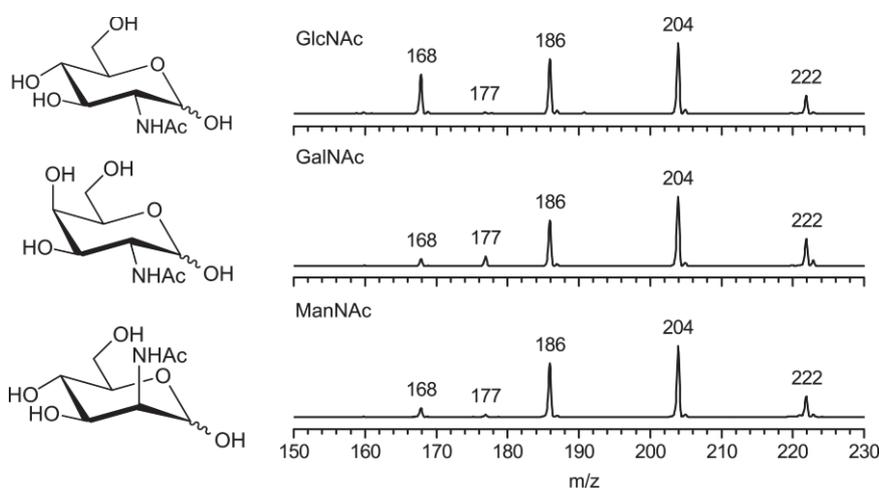


Figure 17 : Spectre MS/MS de différents isomères de la famille des *N*-acétyl hexosamines

Pour dépasser ces limitations, et afin d'obtenir une observable permettant l'identification de ces isomères, il est nécessaire de coupler la spectrométrie de masse avec une méthode permettant d'identifier les différents isomères de carbohydrates. Différentes méthodes ont été développées au cours de ces dernières années pour identifier les monosaccharides comme des méthodes cinétiques et ou de complexations[1–4] mais celles-ci nécessitent la plupart du temps une préparation d'échantillon et sont peu adaptées au séquençage. Par contre, des méthodes orthogonales à la spectrométrie de masse permettent d'obtenir une information structurale en complément de la masse, comme la section efficace de collision grâce à la mobilité ionique,[5–7] ou le spectre vibrationnel grâce à la spectroscopie infrarouge couplée à la spectrométrie de masse. Cette dernière a montré qu'il était possible de différencier des monosaccharides grâce à leur spectre IRMPD dans la région infrarouge disponible grâce aux lasers à électrons libres[8] mais aussi dans la région des lasers OPO grâce à des adduits avec le rubidium.[9] Ces deux méthodes restent utilisables sur des

disaccharides[10–12] et la mobilité ionique reste performante sur des systèmes de plus grosse taille comme les oligosaccharides.[13]

Dans le but d'utiliser ces méthodes orthogonales pour le séquençage, il est nécessaire en se basant sur la nomenclature Domon & Costello,[14] d'être capable d'identifier chacun des fragments, et de vérifier que ceux-ci conservent leur structure moléculaire initiale. Les premières tentatives de séquençage basées sur ce principe ont été réalisées en utilisant la mobilité ionique[15–18] ou la spectroscopie vibrationnelle entre 1000 et 1800 cm^{-1} . [19]

Ce chapitre présentera dans un premier temps les capacités du couplage de la spectrométrie de masse avec la spectroscopie infrarouge dans la région des 3 μm où sont observés les modes d'élongation CH, NH et OH des molécules. Cette métrique sera utilisée afin d'identifier des monosaccharides isomériques, en utilisant différents états de charge accessibles grâce à la spectrométrie de masse. Ensuite la sensibilité de cette méthode sera évaluée vis-à-vis des différentes isoméries présentes pour un disaccharide, à savoir la nature des monosaccharides qui le composent, l'ordre de la séquence ainsi que la position et la configuration de la liaison glycosidique. Puis, les différents fragments obtenus lors d'une séquence MS/MS seront étudiés en termes de nature et de conservation des informations sur la liaison glycosidique. Enfin, grâce aux différentes informations obtenues sur les oses, les disaccharides et la fragmentation, une méthode basée sur la spectrométrie de masse et les informations obtenues grâce aux spectres IRMPD sera proposée pour le séquençage complet d'un oligosaccharide. Finalement, des exemples d'utilisation de cette méthode pour répondre à des questions spécifiques sur la séquence (plutôt que la résolution complète de la séquence) seront présentés sur deux types d'oligosaccharides : chitosan et acide hyaluronique.

1. Différenciation des monosaccharides

1.1. Protoné

1.1.1. *N*-acétyl hexosamine

Les spectres IR des *N*-acétyl hexosamines ont été réalisés sur le couplage du spectromètre de masse (LCQ) avec le laser accordable IR (OPO LaserVision). Pour cela, il est nécessaire de réaliser des solutions à 250 μM de *N*-acétyl hexosamine dans un mélange eau/méthanol (50/50). Afin d'améliorer le signal d'ions, 0,01% d'acide acétique est ajouté.

1.1.1.1. *Analyse conformationnelle de la N-acétyl glucosamine*

Le spectre IR de la *N*-acétyl glucosamine a été réalisé entre 2800 et 3700 cm^{-1} . Afin de pouvoir attribuer les bandes observées dans le spectre IR expérimental, il est nécessaire d'identifier la conformation de la molécule présente en phase gazeuse dans le dispositif expérimental par comparaison avec des

spectres IR théoriques calculés pour différentes conformations. Dans le cas des *N*-acétyl hexosamines, la question de la localisation du proton est importante car deux formes potentielles peuvent être présentes : NH_2^+ ou COH^+ .

La figure 18 représente différentes conformations sélectionnées de la *N*-acétyl glucosamine selon les deux possibilités de protonation. La protonation en COH^+ est plus stable en énergie comparée à la forme NH_2^+ ($\Delta E = +83,6$ kJ/mol). La forme la plus stable est une chaise ${}^4\text{C}_1$ stabilisée par une coordination de ses hydroxyles en position 2, 3, 4 et 6. D'autres formes sont observées pour cette protonation, une structure tridimensionnelle compacte avec une liaison hydrogène entre les hydroxyles en position 3 et 6 au-dessus du plan et des liaisons hydrogènes entre les hydroxyles 2, 1 et 4 en-dessous du plan du cycle. La dernière conformation pour cette protonation est une chaise ${}^4\text{C}_1$ avec une liaison hydrogène entre les hydroxyles en position 2 et 1. Pour les formes NH_2^+ , la forme la plus stable est une chaise ${}^4\text{C}_1$ similaire à la chaise ${}^4\text{C}_1$ la plus stable de la forme COH^+ . La deuxième forme sélectionnée est une chaise ${}^1\text{C}_4$ avec une liaison hydrogène entre les hydroxyles 3 et 6.

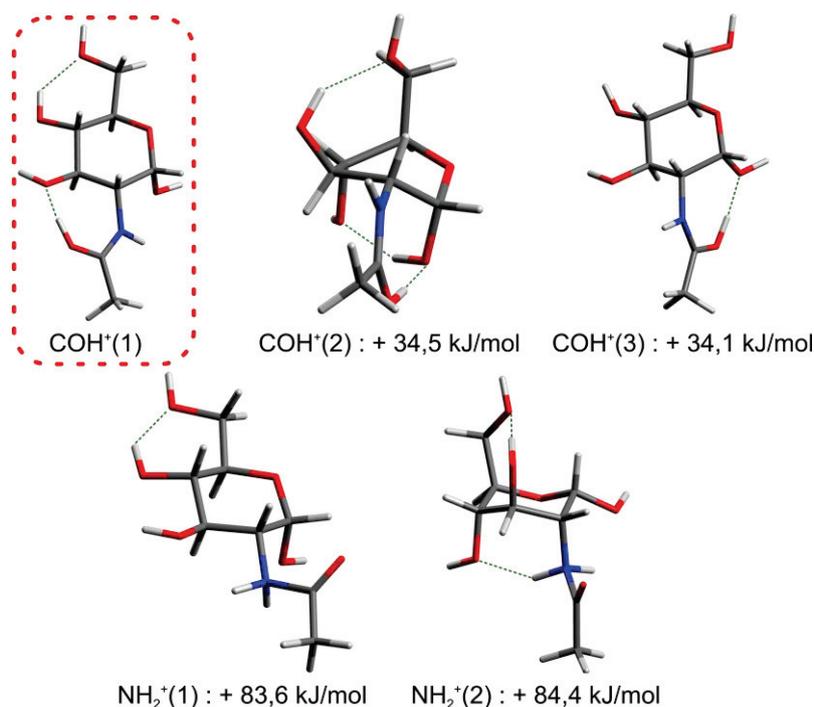


Figure 18 : Différentes conformations de basse énergie de la *N*-acétyl glucosamine selon son site de protonation, calculées par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd)

La figure 19 compare le spectre IRMPD de la *N*-acétyl glucosamine aux spectres IR théoriques calculés pour différentes conformations selon les deux possibilités de protonation. Le spectre expérimental est composé d'un motif entre 2800 et 3000 cm^{-1} correspondant aux élongations CH, d'une bande à 3384 cm^{-1} pouvant être assignée à une élongation d'un NH, et enfin d'un motif composé de quatre bandes entre 3500 et 3700 cm^{-1} correspondant à des élongations OH.

Les spectres IR théoriques des formes NH_2^+ comportent deux bandes d'élongation NH entre 3000 et 3300 cm^{-1} selon leur conformation, alors que les formes protonées en $\text{C}=\text{OH}^+$ ne possèdent qu'une seule bande d'élongation NH entre 3250 et 3450 cm^{-1} selon leur conformation. Le spectre IR expérimental n'ayant qu'une seule bande entre 3000 et 3450 cm^{-1} est en accord avec une protonation de forme COH^+ . Les spectres IR théoriques sont très différents selon leur conformation, pour la forme $\text{COH}^+(2)$ un écart de 100 cm^{-1} est observé pour le mode d'élongation NH et le motif des modes OH ne coïncide pas avec le spectre expérimental. Pour la forme $\text{COH}^+(3)$, un écart de 50 cm^{-1} est observé pour la bande NH et le motif OH est resserré au-dessus de 3600 cm^{-1} alors que deux bandes sont observées expérimentalement entre 3500 et 3600 cm^{-1} . Enfin, les bandes calculées de la forme la plus stable énergétiquement, $\text{COH}^+(1)$, correspondent parfaitement aux bandes observées expérimentalement mise à part dans la région des modes d'élongation CH, où elles sont mal représentées. À noter également que la bande OH du carbonyle protoné n'est pas observée dans cette gamme d'énergie puisque celle-ci est fortement liée. Finalement, les bandes d'élongation OH à 3536, 3586, 3635 et 3673 cm^{-1} peuvent être respectivement attribuées à OH(4), OH(3), OH(1) et OH(6).

Le spectre expérimental possède des épaulements visibles sur les bandes à 3536 et 3583 cm^{-1} suggérant la présence d'une deuxième forme. Or comme le spectre IR expérimental a été réalisé à partir d'une solution de *N*-acétyl glucosamine, celle-ci peut être présente sous ses deux formes anomériques α et β (vu précédemment chapitre I). Les fréquences IR théoriques, de l'anomère β pour la conformation la plus basse en énergie, sont hachurées sur la figure 19 et expliquent ces différents épaulements. Dans ces conditions, les spectres IR expérimentaux des différents hexoses seront en réalité un mélange des spectres IR des anomères α et β de ceux-ci, complexifiant ainsi la signature vibrationnelle obtenue. Les proportions en anomères dépendent de l'équilibre entre ces deux formes dans nos conditions de solution et de la molécule étudiée.

Finalement en phase gazeuse, la *N*-acétyl glucosamine est présente sous la forme $\text{COH}^+(1)$, c'est-à-dire que le proton est localisé au niveau de l'oxygène de l'acétyl et le sucre adopte une conformation de type chaise ${}^4\text{C}_1$ avec une interaction entre l'hydroxyle en position 4 et l'oxygène en position 6 correspondant à la forme de plus basse énergie prédite (forme encadrée sur la figure 18). De plus un mélange des anomères α et β de la *N*-acétyl glucosamine est observé.

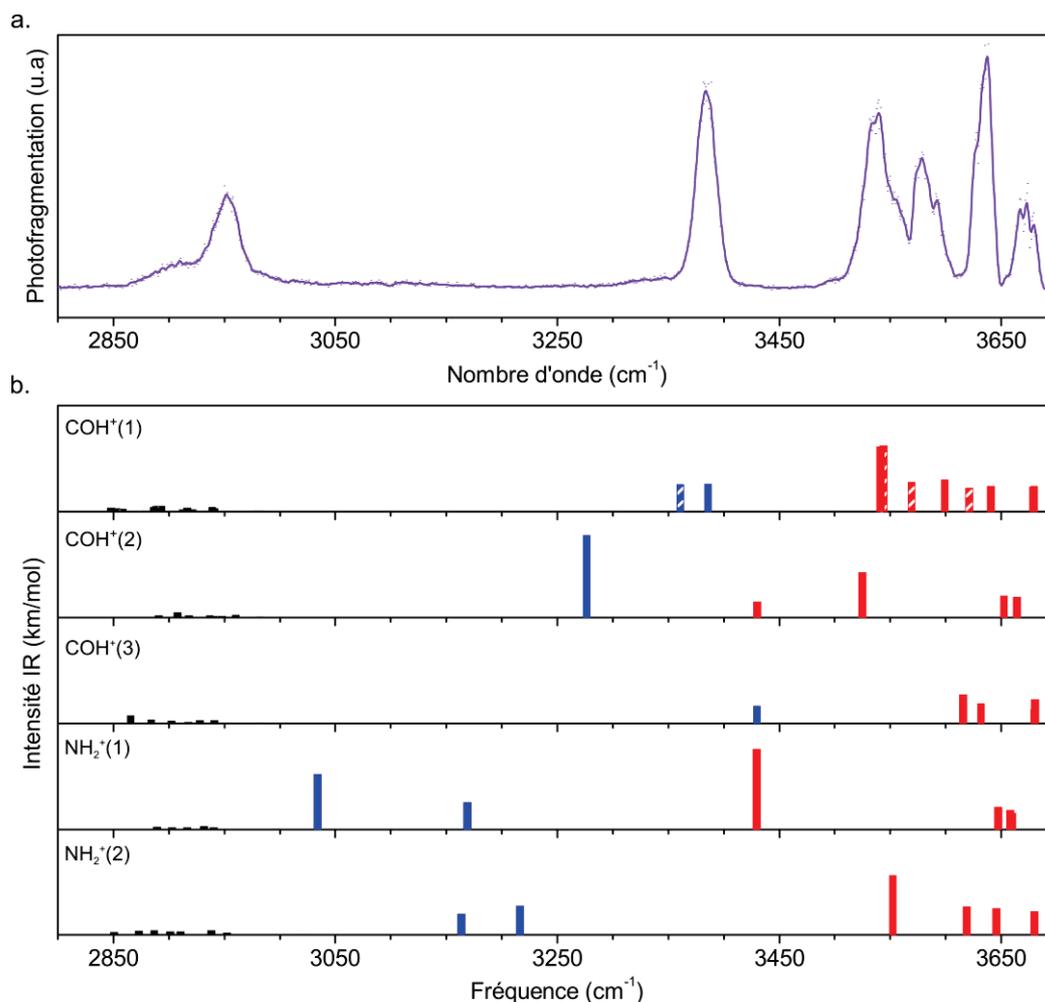


Figure 19 : Spectre IRMPD de la *N*-acétyl glucosamine (a) comparé aux spectres IR théoriques (b) obtenus par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd). Un facteur correctif de 0,947 a été appliqué sur les fréquences infrarouges théoriques. Les élongations OH sont représentées en rouge, les élongations NH en bleu et les élongations CH en noir. Le spectre de l'anomère β de la forme la plus stable est représenté avec des hachures.

1.1.1.2. Différenciation des isomères de la famille des *N*-acétyl hexosamines

Les spectres IR expérimentaux de la *N*-acétyl mannosamine et de la *N*-acétyl galactosamine ont été réalisés dans les mêmes conditions que celui de la *N*-acétyl glucosamine. Une comparaison avec des spectres IR théoriques a également été réalisée afin d'attribuer une structure moléculaire correspondant à chacun des spectres expérimentaux réalisés (voir Annexe 1.1).

La figure 20 représente les spectres IR expérimentaux de la *N*-acétyl glucosamine, *N*-acétyl galactosamine et *N*-acétyl mannosamine entre 2700 et 3700 cm⁻¹. Ces trois spectres sont composés d'un motif CH compris entre 2800 et 3000 cm⁻¹, d'une région comprenant des modes NH et des modes OH liés entre 3300 et 3600 cm⁻¹ et d'une région correspondant aux modes OH libres entre 3600 et 3700 cm⁻¹. La première région, entre 2800 et 3000 cm⁻¹ est similaire pour chacune de ces trois espèces avec une bande intense commune à 2952 cm⁻¹. La région des modes NH et des modes OH liés est quant

à elle spécifique à la nature du sucre. La première bande observée, qui correspond au mode NH, se décale selon l'environnement proche. Cette bande est présente à 3385, 3390 et 3365 cm^{-1} pour respectivement la *N*-acétyl glucosamine, la *N*-acétyl galactosamine et la *N*-acétyl mannosamine. Ce décalage vers les basses énergies pour cette dernière suggère un mode NH faiblement lié. À noter également l'existence d'une deuxième bande à 3396 cm^{-1} indiquant la présence d'une deuxième forme. Les modes OH liés sont ensuite observés entre 3400 et 3600 cm^{-1} , ceux-ci sont présents à 3536 et 3586 cm^{-1} pour la *N*-acétyl glucosamine, à 3431 et 3467 cm^{-1} pour la *N*-acétyl galactosamine, 3552, 3584 et 3603 cm^{-1} pour la *N*-acétyl mannosamine. Enfin la région des OH libres est caractérisée par deux bandes, la première à 3635 cm^{-1} pour la *N*-acétyl glucosamine et *N*-acétyl galactosamine et à 3645 cm^{-1} pour la *N*-acétyl mannosamine. La seconde est étendue entre 3660 et 3683 cm^{-1} .

Le spectre IR de la *N*-acétyl glucosamine se différencie donc de celui de ses deux épimères. Le spectre IR de la *N*-acétyl galactosamine est caractérisé par des modes OH décalés vers les basses énergies comparé à la *N*-acétyl glucosamine, ceci s'explique par la présence des hydroxyles 3, 4 et 6 au-dessus du plan et donc en forte interaction entre eux. De son côté, la *N*-acétyl mannosamine dont le groupement acétamido est au-dessus du plan du sucre possède un spectre IR où un décalage important dans le positionnement du mode NH pour les anomères α et β est observé. Le motif dans la région OH/NH dépend de l'orientation de chacun des groupements présents sur le cycle du sucre et ces signatures distinctes permettent de différencier les trois principales *N*-acétyl hexosamines grâce à leur spectre IR et donc au couplage de la spectrométrie de masse avec la spectroscopie laser IR.

Il est à remarquer que l'identification se fait directement par la mesure du spectre IRMPD, et qu'aucune analyse théorique n'est nécessaire pour distinguer ces isomères. Une étude théorique n'est requise que pour réaliser une analyse conformationnelle.

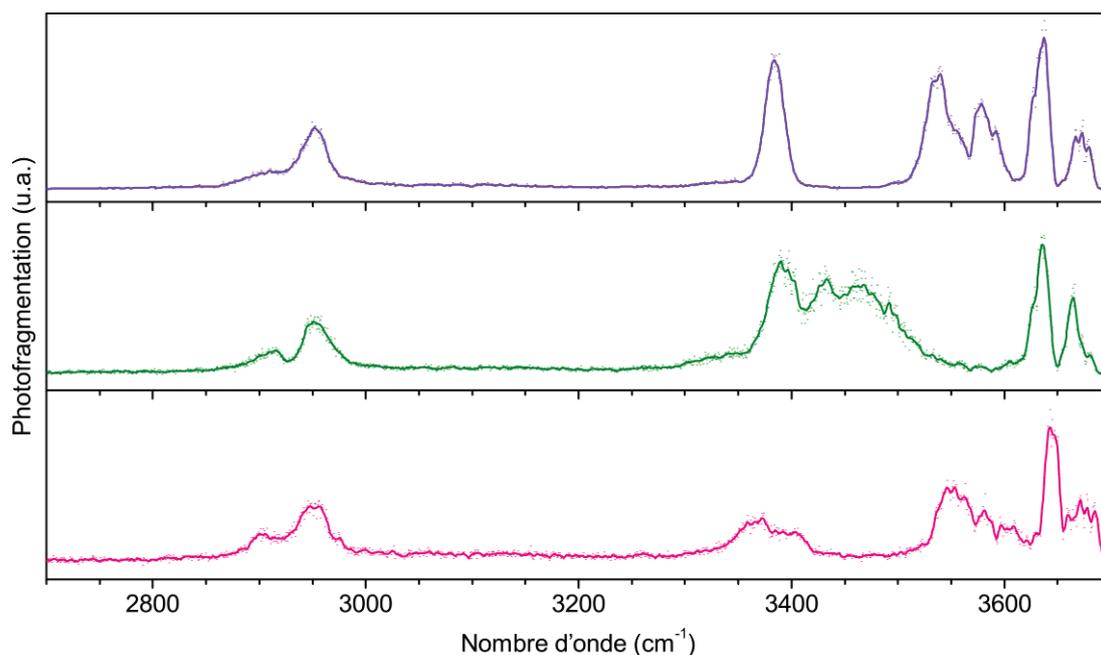


Figure 20 : spectres IRMPD de la *N*-acétyl glucosamine (violet), *N*-acétyl galactosamine (vert) et *N*-acétyl mannosamine (rose)

1.1.2. Hexosamine

Les spectres IR expérimentaux des hexosamines ont été réalisés dans les mêmes conditions que ceux des *N*-acétyl hexosamines. Une étude théorique a également été réalisée afin d'attribuer la structure moléculaire de la glucosamine, galactosamine et mannosamine dans nos conditions expérimentales. La localisation du proton sur l'amine semble la plus favorable et est confirmée par la comparaison du motif des modes NH présent sur les spectres IR expérimentaux avec celui proposé théoriquement. L'étude théorique complète de la glucosamine sera présentée dans le chapitre 4 et la comparaison entre les spectres IR expérimentaux et théoriques pour les deux autres hexosamines est présentée en annexe 1.2.

La figure 21 représente les spectres IR expérimentaux de la glucosamine, galactosamine et mannosamine entre 2700 et 3700 cm^{-1} . Ces spectres sont composés de quatre régions distinctes, la région des modes CH entre 2800 et 3000 cm^{-1} , la région des modes NH entre 3000 et 3400 cm^{-1} et la région des modes OH liés entre 3400 et 3600 cm^{-1} et enfin celle des modes OH libres entre 3600 et 3700 cm^{-1} . Des régions sont similaires avec les *N*-acétyl hexosamines, celle des modes CH et celle des modes OH libres. La position de la bande la plus intense de la région CH fluctue et elle est observée à 2952, 2945 et 2956 cm^{-1} pour respectivement la glucosamine, galactosamine et mannosamine. Dans la région des OH libres, le motif est similaire pour ces trois hexosamines avec la présence d'une bande intense vers 3638 cm^{-1} et une bande plus étalée autour de 3663 cm^{-1} . Toutefois, pour le spectre de la glucosamine, une bande supplémentaire est observée dans cette région à 3615 cm^{-1} . La région entre

3000 et 3400 cm^{-1} est caractérisée par la présence de 2 à 6 bandes NH formant un motif complexe et diagnostique de la nature de l'hexosamine. Enfin, pour la région des OH liés, deux bandes sont observées à 3424 et 3548 cm^{-1} pour la glucosamine, 3490 et 3565 cm^{-1} pour la galactosamine et une seule bande est observée pour la mannosamine à 3550 cm^{-1} .

Comme pour les *N*-acétyl hexosamines, il est possible de différencier les hexosamines grâce à la mesure de leur spectre vibrationnel. Ces spectres mettent en évidence la présence de plusieurs formes anomériques pour le spectre d'une même hexosamine grâce à un motif NH complexe qui dépend de son environnement proche, entre autres, l'orientation de l'hydroxyle en position 1.

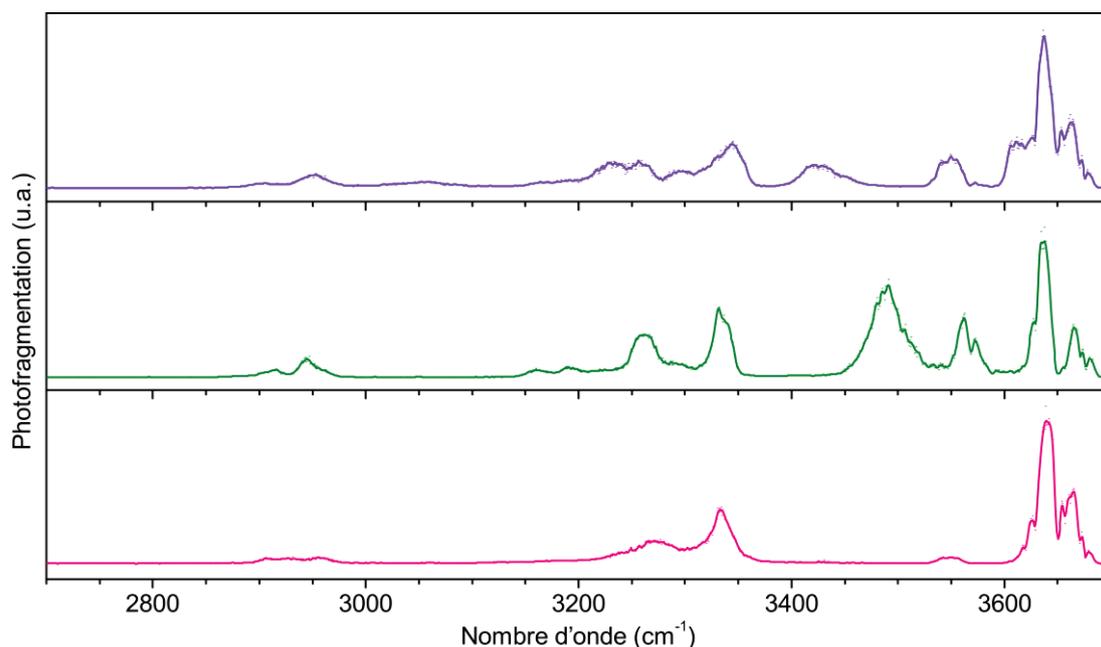


Figure 21 : spectres IRMPD de la glucosamine (violet), galactosamine (vert) et mannosamine (rose)

1.2. Adduit

La nature d'un hexose non modifié ne permet pas facilement sa protonation en électrospray. Des états de charge alternatifs permettent d'observer ces oses en spectrométrie de masse, par exemple grâce à l'ajout d'un adduit cationique de la famille des métaux alcalins. Les adduits au lithium ont l'avantage de permettre d'observer des fragmentations des oses similaires aux fragmentations des espèces protonées. Sodium, potassium, et rubidium sont également utilisés pour former des adduits cationiques avec des oses, en revanche, ils ont tendance lors de la fragmentation dans le piège d'uniquement se dissocier du saccharide. Il est alors difficile d'observer l'ion fils formé à cause de l'impossibilité d'observer de petites masses lors de l'isolation dans un piège à ions.

Les spectres IR des hexoses ont été réalisés sur le couplage du spectromètre de masse (LCQ) avec le laser accordable IR (OPO LaserVision) à partir d'une solution de 250 μM de l'hexose étudié et 50 μM

de LiCl dans un mélange eau/méthanol (50/50). Les adduits au lithium nécessitent plus d'énergie pour se fragmenter, c'est pourquoi la région CH n'est pas accessible à la photofragmentation dans nos conditions actuelles d'expérimentation.

La figure 22 représente les spectres IRMPD avec adduit au lithium du glucose, galactose et mannose entre 3200 et 3700 cm^{-1} . Ces spectres sont constitués de deux régions, entre 3200 et 3500 cm^{-1} où sont présents les OH fortement liés et entre 3500 et 3700 cm^{-1} qui correspond à une région comprenant les modes OH libres ou peu liés. Le glucose est le seul hexose à présenter une bande OH dans la région des OH liés, celle-ci, centrée à 3370 cm^{-1} est très étalée et de faible intensité. L'autre partie du spectre concentre donc la majorité des bandes vibrationnelles. Le spectre du galactose est composé de nombreuses bandes peu liées à 3562, 3579 et 3608 cm^{-1} contrairement aux deux autres qui ne possèdent que deux bandes partiellement résolues à respectivement 3607 et 3616 cm^{-1} pour le mannose, et 3585 et 3600 cm^{-1} pour le glucose. Enfin, ces spectres IR sont composés d'un motif de bandes libres caractéristique de la nature de ces hexoses compris entre 3632 et 3683 cm^{-1} .

Malgré une perte d'information dans la région des CH et donc la présence uniquement des bandes correspondant aux modes d'élongation des OH, il est possible de différencier la nature des différents hexoses non modifiés grâce à leur spectre vibrationnel.

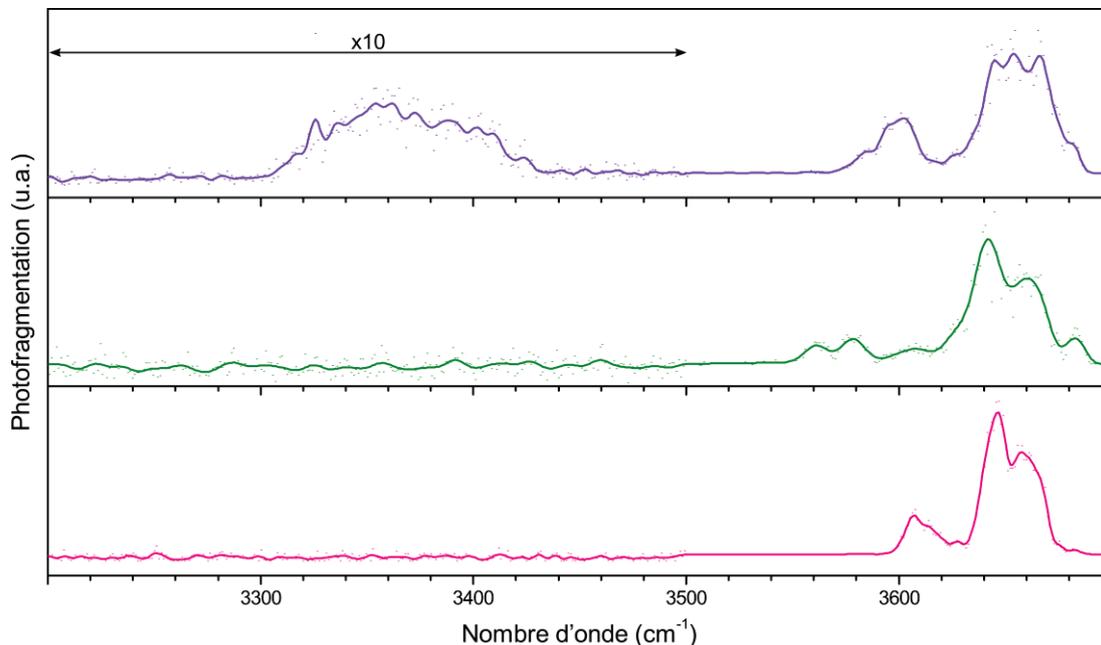


Figure 22 : spectres IRMPD des adduits au lithium du glucose (violet), galactose (vert) et mannose (rose)

1.3. Déprotoné

Les acides hexuroniques sont des hexoses ayant subi une oxydation au niveau de leur alcool primaire. Ces molécules sont présentes dans certains polysaccharides de la famille des glycosaminoglycanes ou

dans certains hétérosides. Ils sont préférentiellement déprotonés par électrospray puisqu'ils sont de nature acide. Les spectres IR des acides D-glucuronique et L-iduronique déprotonés ont été réalisés entre 2600 et 3700 cm^{-1} sur le couplage LCQ/OPO à partir d'une solution de 250 μM de l'acide hexuronique étudié et 50 μM de sulfate d'ammonium dans un mélange eau/méthanol (50/50).

Les spectres IR des acides D-glucuronique et L-iduronique sont représentés entre 2600 et 3700 cm^{-1} en figure 23. Ces spectres sont composés de deux régions distinctes, les bandes des modes d'élongation des CH sont présentes entre 2700 et 3000 cm^{-1} et au-dessus de 3000 cm^{-1} sont observées les bandes des modes d'élongation des OH qui peuvent être liés ou libres au-dessus de 3600 cm^{-1} . Les deux spectres IR de ces acides possèdent des bandes très liées et donc très larges, toutefois il est possible de différencier ces deux molécules qui ne diffèrent que de l'orientation de leur acide carboxylique. Le spectre IR de l'acide D-glucuronique est composé de deux bandes dans la région des CH à 2810 et 2875 cm^{-1} , et d'un motif de bandes OH liés centré autour de 3325 cm^{-1} . Le spectre IR de l'acide L-iduronique est lui composé de trois bandes dans la région CH à 2800, 2879 et 2915 cm^{-1} , d'un motif de modes OH liés centré à 3265 cm^{-1} et d'une bande OH libre à 3585 cm^{-1} .

Les épimères de la famille des acides hexuroniques peuvent donc être différenciés sous leur forme déprotonée grâce à leur spectre IR entre 2600 et 3700 cm^{-1} . Il est caractérisé par l'absence de bandes OH libres entre 3600 et 3700 cm^{-1} contrairement à ce qui est observé pour les autres familles des oses étudiés sous forme protonée ou avec un adduit.

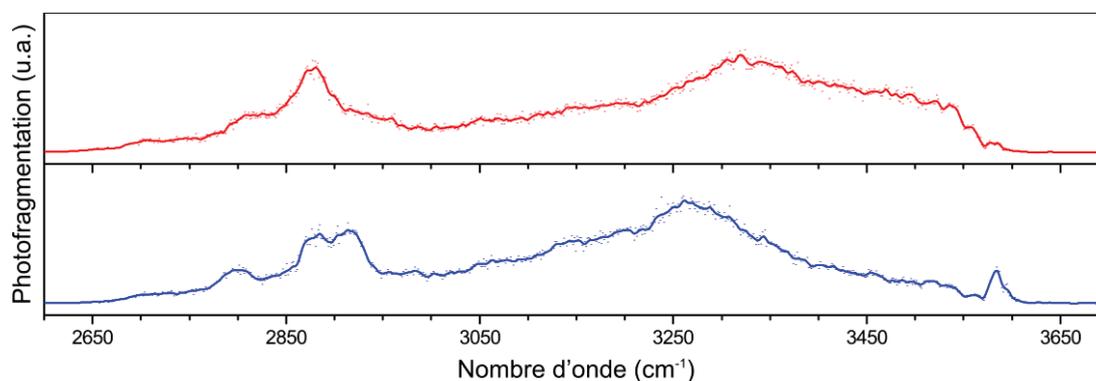


Figure 23 : Spectres IRMPD des acides D-glucuronique (rouge) et L-iduronique (bleu) déprotonés

1.4. Conclusion

Alors que la spectrométrie de masse seule est limitée pour différencier les différents oses existants, le couplage avec la spectroscopie IR permet d'obtenir une information précise sur la nature de ceux-ci grâce à leur spectre IRMPD. Ceci est possible pour une importante variété d'états de charges, que les oses soient protonés, déprotonés ou même présents avec un adduit, permettant l'analyse des différentes familles des oses.

2. Différenciation des disaccharides

Le spectre IR d'un ose permet de l'identifier par rapport à ses isomères, toutefois dans le cas des disaccharides, le nombre de possibilités d'isomères augmente largement. Pour que le spectre IR d'un disaccharide permette son identification, il faut que le spectre vibrationnel soit sensible aux différentes isoméries possibles entre deux disaccharides. Il est nécessaire de pouvoir différencier deux disaccharides qui ne diffèrent que par :

- La nature de l'un de ses monosaccharides
- La position de leur liaison glycosidique (régiochimie)
- La configuration α ou β de leur liaison glycosidique (stéréochimie)
- La séquence des constituants

La figure 24 représente la *N*-acétyl lactosamine ainsi que quatre de ses isomères, qui ont été sélectionnés afin de vérifier les quatre possibilités d'isomérie présentées ci-dessus qu'il convient de différencier.

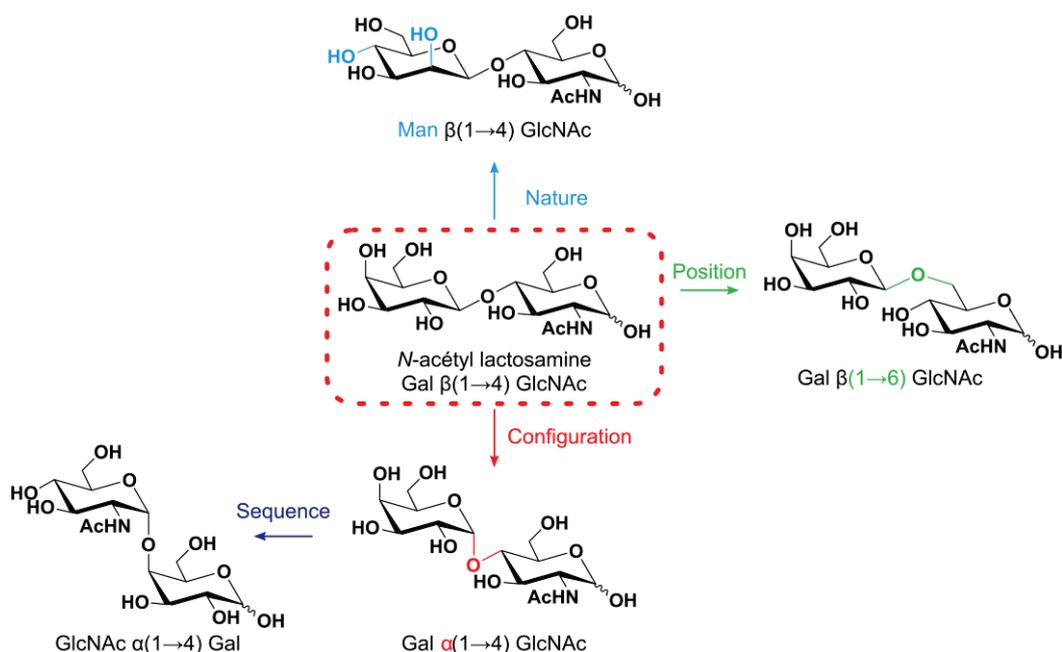


Figure 24 : Représentation des différentes isoméries observables sur un disaccharide

2.1. Nature

La figure 25 représente les spectres IR entre 2700 et 3700 cm^{-1} du 2-acétamido-2-deoxy-4-O- β -D-galactopyranosyl-D-glucopyranose (noir) et du 2-acétamido-2-deoxy-4-O- β -D-mannopyranosyl-D-glucopyranose (bleu clair) qui sont deux disaccharides qui ne diffèrent que par la nature de l'ose non réducteur, un galactose ou un mannose. Ces spectres sont constitués de trois régions, la région des modes d'élongation CH entre 2800 et 3000 cm^{-1} , la région des modes d'élongation NH/OH liés entre

3000 et 3500 cm^{-1} et la région des modes d'élongation OH entre 3500 et 3700 cm^{-1} . Entre 2700 et 3450 cm^{-1} , les spectres IR des deux isomères possèdent des motifs similaires, avec uniquement de petites variations d'intensité. Ils sont composés de deux bandes à 2905 et 2950 cm^{-1} , comparables aux bandes CH des monosaccharides, un motif étalé entre 3000 et 3300 cm^{-1} , et une bande à 3405 cm^{-1} cohérente avec la bande NH observée pour les *N*-acétyl hexosamines. Par contre, des bandes diagnostiques sont observables dans la région des modes d'élongation OH, six bandes sont présentes pour le 2-acetamido-2-deoxy-4-O- β -D-galactopyranosyl-D-glucopyranose à 3558, 3583, 3595, 3609, 3638 et 3665 cm^{-1} et seulement quatre bandes sont observables pour le 2-acetamido-2-deoxy-4-O- β -D-mannopyranosyl-D-glucopyranose à 3605, 3627, 3638 et 3663 cm^{-1} .

Une différence notable dans la région des modes d'élongation OH est observée lorsque l'on modifie uniquement l'un des constituants d'un disaccharide, il est donc possible de différencier deux isoméries de nature sur des disaccharides.

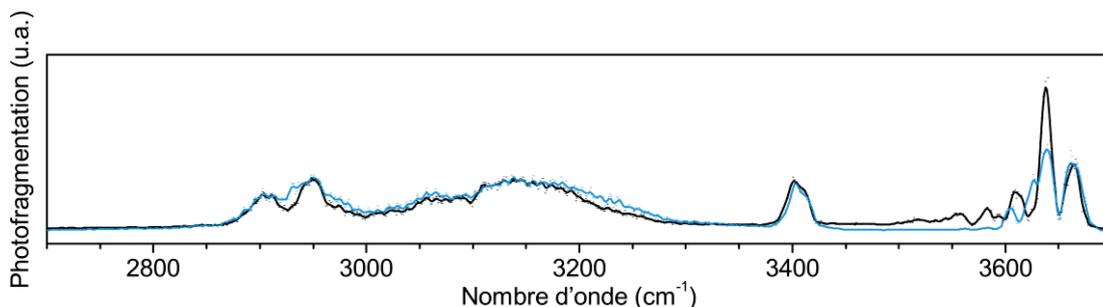


Figure 25 : spectres IRMPD de Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc (noir) et Man $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc (bleu clair)

2.2. Position de la liaison

La figure 26 représente les spectres IR entre 2700 et 3700 cm^{-1} du 2-acetamido-2-deoxy-4-O- β -D-galactopyranosyl-D-glucopyranose (noir) et du 2-acetamido-2-deoxy-6-O- β -D-galactopyranosyl-D-glucopyranose (vert) qui sont deux disaccharides qui ne diffèrent que par la position de la liaison glycosidique, l'ose réducteur est soit lié sur l'hydroxyle en position 4 soit en position 6. Le spectre IR de ce dernier possède des régions CH et NH/OH liés différentes, caractérisées par un motif CH décalé de 30 cm^{-1} vers les plus basses énergies, et un motif des bandes liées de plus faible intensité. La différence la plus notable est au niveau de la bande à 3405 cm^{-1} qui est absente et remplacée par une bande étalée, centrée à 3445 cm^{-1} . Dans la région des OH libres ou peu liés, trois bandes sont observées à 3597, 3638 et 3654 cm^{-1} . Par comparaison avec les spectres IR théoriques des oses, la bande la plus haute en énergie peut être attribuée à un OH(6), expliquant la largeur réduite de celle-ci pour l'isomère de liaison $\beta 1,6$ n'ayant qu'un seul OH(6) au lieu de deux.

D'importantes modifications dans le spectre IRMPD sont visibles lorsque la position de la liaison glycosidique est modifiée. Cela s'explique par la disparition du mode d'élongation OH impliqué dans cette liaison et par la forte variation d'interactions inter-ose. Il est donc possible de distinguer deux isomères qui ne diffèrent que par la position de leur liaison glycosidique.

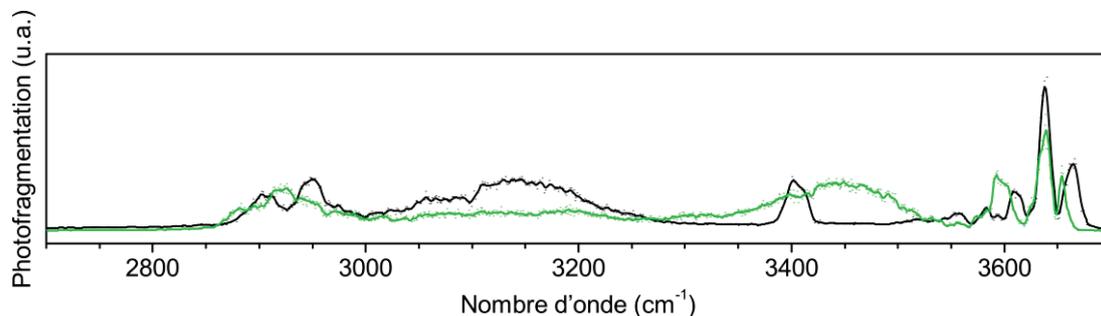


Figure 26 : spectres IRMPD de Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc (noir) et Gal $\beta(1\rightarrow6)$ GlcNAc (vert)

2.3. Stéréo de la liaison

La figure 27 représente les spectres IRMPD entre 2700 et 3700 cm^{-1} du 2-acetamido-2-deoxy-4-O- β -D-galactopyranosyl-D-glucopyranose (noir) et du 2-acetamido-2-deoxy-4-O- α -D-galactopyranosyl-D-glucopyranose (rouge), deux disaccharides ne différant que par la configuration de leur liaison glycosidique. Comme pour la nature des constituants, la région comprise entre 2700 et 3500 cm^{-1} n'est pas spécifique, et uniquement des différences d'intensité sont observées. La région entre 3500 et 3700 cm^{-1} est, elle, caractéristique de la configuration de la liaison glycosidique. En effet, quatre bandes sont observées à 3532, 3585, 3638 et 3667 cm^{-1} pour le 2-acetamido-2-deoxy-4-O- α -D-galactopyranosyl-D-glucopyranose, permettant ainsi de le différencier de son isomère de configuration β .

La modification de la configuration de la liaison glycosidique entraîne une conformation différente de la molécule, ce qui implique d'autres liaisons intramoléculaires entre les hydroxyles, se caractérisant par une modification du spectre IR, essentiellement dans la région des modes d'élongation des OH. Le couplage de la spectrométrie de masse à la spectroscopie IR est suffisamment sensible pour permettre l'identification de deux isomères qui ne diffèrent que par la configuration α ou β de leur liaison glycosidique.

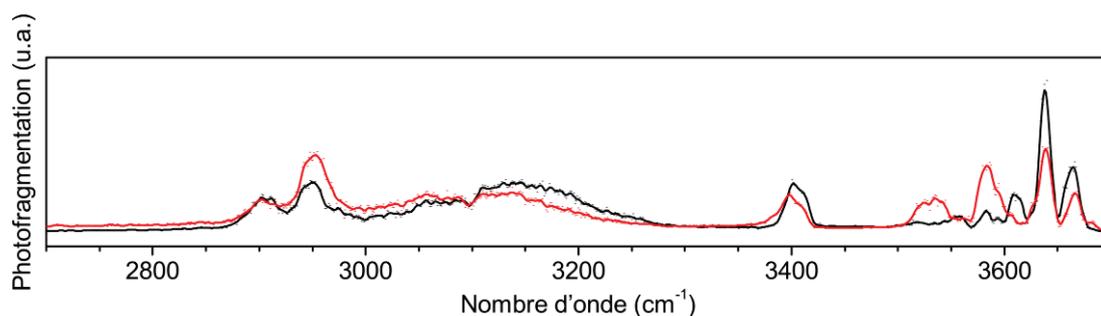


Figure 27 : spectres IRMPD de Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc (noir) et Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc (rouge)

2.4. Séquence

La dernière condition pour que le couplage de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie IR soit une méthode performante pour l'analyse de disaccharides est qu'il permette de distinguer deux disaccharides qui diffèrent uniquement par l'ordre de la séquence des deux constituants.

La figure 28 représente les spectres IRMPD entre 2700 et 3700 cm^{-1} du 2-acetamido-2-deoxy-4-O- α -D-galactopyranosyl-D-glucopyranose et du 4-O-[2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl]-D-galactopyranose. Ce dernier est composé d'un motif CH entre 2800 et 3000 cm^{-1} , de bandes fortement liées entre 3000 et 3200 cm^{-1} et d'un motif de bandes des modes d'élongation des OH entre 3500 et 3700 cm^{-1} . La bande habituellement présente sur les autres disaccharides autour de 3400 cm^{-1} est absente suggérant que le groupe NH est fortement lié. Les modes d'élongation des OH sont observés à 3546, 3592, 3644 et 3655 cm^{-1} . L'absence de bande à 3400 cm^{-1} et la présence d'une bande à 3655 cm^{-1} permettent de différencier aisément le 4-O-[2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl]-D-galactopyranose du 2-acetamido-2-deoxy-4-O- α -D-galactopyranosyl-D-glucopyranose.

L'ordre de la séquence se répercute également sur le spectre IRMPD de ces molécules, puisque les interactions moléculaires diffèrent et permettent de différencier deux disaccharides qui ne diffèrent que par l'ordre de leur séquence.

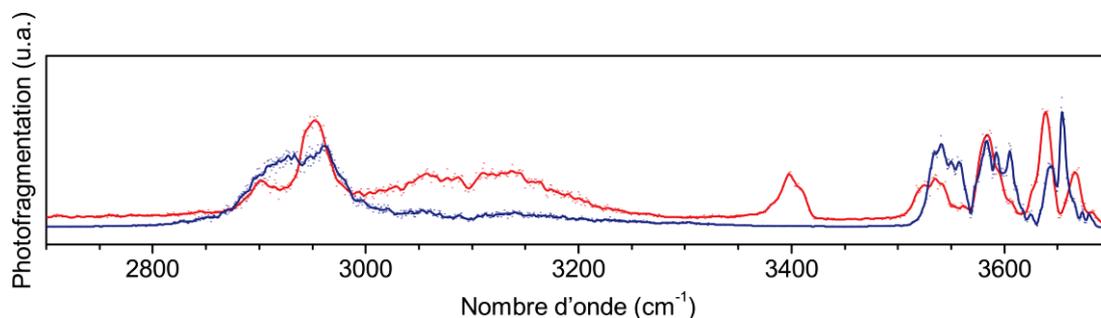


Figure 28 : spectres IRMPD de Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc (rouge) et GlcNAc $\alpha(1\rightarrow4)$ Gal (bleu foncé)

2.5. Conclusion

Le couplage de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie IR permet d'obtenir une signature spécifique pour chaque disaccharide. En effet, la signature IR est suffisamment sensible pour distinguer la séquence, la nature, la position et la configuration de la liaison glycosidique de deux disaccharides de même masse. Les spectres IRMPD de ces différents monosaccharides et disaccharides seront utilisés comme base de données pour le séquençage des carbohydrates.

3. Informations retenues lors de la fragmentation

Dans l'optique de séquencer un oligosaccharide, il est nécessaire de caractériser chacun des fragments d'intérêt lors de la fragmentation de celui-ci, c'est-à-dire des fragments retenant la nature des constituants ainsi que la position et la configuration des liaisons glycosidiques. La nomenclature Domon & Costello représentée en figure 29, établit quatre ions potentiellement utiles pour obtenir la structure initiale du polymère. Dans le cas d'un disaccharide, les fragments C et Y correspondent respectivement aux monosaccharides entiers de l'extrémité non réductrice et réductrice alors que les fragments B et Z quant à eux représentent les résidus restant après rupture de la liaison glycosidique pour obtenir respectivement les fragments Y et C. D'après cette représentation, le fragment C pourrait donner la nature du sucre non réducteur et la configuration de la liaison glycosidique ; le fragment Z serait caractéristique de la position de la liaison glycosidique et enfin, le fragment Y identifierait la nature du constituant réducteur du disaccharide. Toutefois, la structure moléculaire de ces fragments n'a jamais été élucidée par manque d'outils de caractérisation, le couplage de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie IR est donc tout particulièrement adapté pour identifier ces fragments et définir lesquels sont pertinents en vue de séquencer des oligosaccharides.

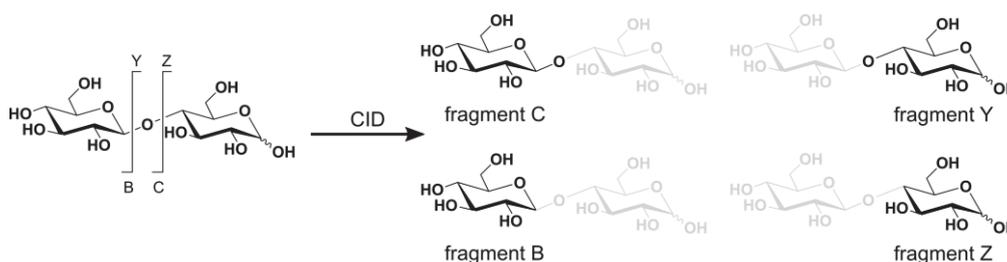


Figure 29 : Nomenclature Domon & Costello, principaux ions d'intérêts obtenus en spectrométrie de masse après fragmentation

3.1. Fragment Y

Pour identifier les informations retenues lors de la fragmentation, la *N*-acétyl lactosamine a été choisie. Celle-ci est constituée d'un galactose relié par une liaison β 1,4 à une *N*-acétyl glucosamine. Ce

disaccharide est fragmenté au sein du piège d'ions entraînant la formation de différents fragments représentés sur la figure 30.

La *N*-acétyl lactosamine de $m/z = 384$ se fragmente en trois ions majoritaires de $m/z = 366$, 222 et 204 et deux ions de faible intensité à $m/z = 186$ et 168. L'ion de $m/z = 366$ correspond au disaccharide ayant perdu une molécule d'eau, et celui de $m/z = 222$ est identifié comme le fragment Y, c'est-à-dire la *N*-acétyl glucosamine de ce disaccharide. Les autres masses observées correspondent à des déshydratations successives de cette *N*-acétyl glucosamine.

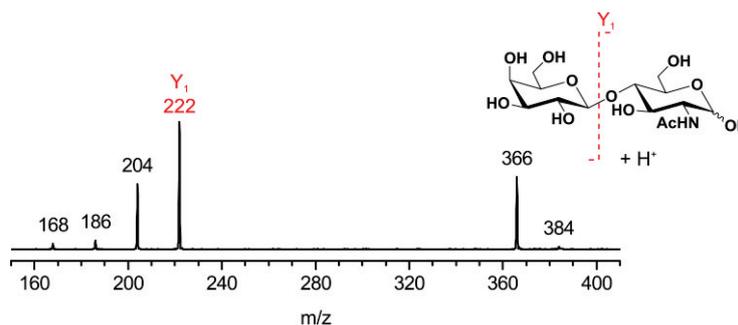


Figure 30 : Spectre MS/MS de la *N*-acétyl lactosamine CID : 20% isolation : 30 ms

L'ion de $m/z = 222$ correspondant au fragment Y est isolé dans le piège afin de réaliser son spectre IRMPD entre 2700 et 3700 cm^{-1} . Il est représenté en figure 31 et est composé d'un motif CH dans la région 2800-3000 cm^{-1} , d'une bande à 3384 cm^{-1} caractéristique d'un mode d'élongation NH et de quatre bandes dans la région des modes d'élongation OH à 3536, 3586, 3635 et 3673 cm^{-1} avec un léger épaulement pour les deux premières. Par comparaison avec les spectres IRMPD de référence des *N*-acétyl hexosamines représentés sur la figure 20, la signature IR du fragment Y correspond parfaitement à celle de la *N*-acétyl glucosamine. Comme décrit lors de l'analyse de la *N*-acétyl glucosamine, la présence d'épaulements au niveau des bandes autour de 3500 cm^{-1} suggère un mélange anomérique. Le fragment Y de la *N*-acétyl lactosamine est identifié comme étant une *N*-acétyl glucosamine ce qui correspond effectivement à la nature de l'ose situé à l'extrémité réductrice de ce disaccharide.

Lors de la fragmentation d'un disaccharide en spectrométrie de masse, le fragment Y conserve la structure moléculaire de l'ose constituant, ce qui permet de l'identifier grâce à sa signature infrarouge. De plus, la présence d'un mélange d'anomères α/β observable sur le spectre IRMPD donne une indication sur caractère réducteur de l'ose observé et permet d'identifier sa position dans la séquence.

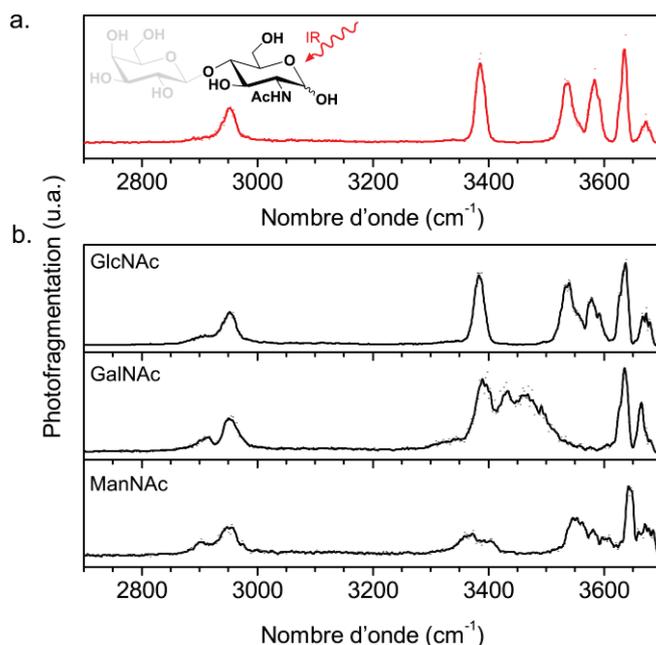


Figure 31 : spectre IRMPD du fragment Y de la *N*-acétyl lactosamine (a) comparé aux spectres de référence des différentes *N*-acétyl hexosamines (b) que sont la *N*-acétyl glucosamine, *N*-acétyl galactosamine et *N*-acétyl mannosamine

3.2. Fragment C

D'après la nomenclature de Domon & Costello, le fragment C correspond pour un disaccharide au monosaccharide en position non réductrice. Pour la *N*-acétyl lactosamine protonée, celui-ci devrait être observé à $m/z = 181$ mais son spectre MS/MS n'en contient pas car la charge est séquestrée par la *N*-acétyl glucosamine. Pour observer le fragment C, il est nécessaire de s'intéresser à la fragmentation de ce disaccharide en utilisant d'autres états de charge. Par exemple, en ajoutant du chlorure de lithium à la solution, le disaccharide avec adduit au lithium est observé. Son spectre MS/MS est représenté sur la figure 32 et montre la présence d'un fragment C.

La *N*-acétyl lactosamine avec un adduit au lithium est observée à $m/z = 390$, et lors de sa fragmentation, le fragment majoritairement observé de $m/z = 372$ correspond au disaccharide ayant perdu une molécule d'eau. Toutefois, des ions intéressants pour le séquençage sont observés, l'ion de $m/z = 228$ est identifié comme une *N*-acétyl glucosamine avec un adduit lithium et celui de $m/z = 210$ correspond à son équivalent déshydraté. Enfin, le fragment C est observé à $m/z = 187$, c'est-à-dire le galactose avec un adduit au lithium et son équivalent déshydraté, le fragment B est présent à $m/z = 169$.

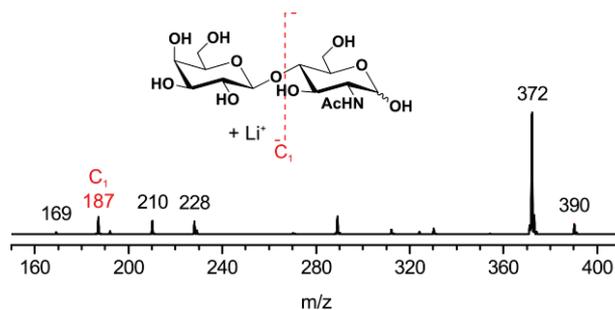


Figure 32 : Spectre MS/MS de la *N*-acétyl lactosamine avec adduit au lithium

Le fragment C ainsi obtenu est isolé dans le piège à ions afin de réaliser son spectre IRMPD entre 3200 et 3700 cm^{-1} . Celui-ci est représenté en figure 33 et est composé de deux bandes de faible intensité à 3562 et 3579 cm^{-1} ainsi que d'un motif de modes OH entre 3632 et 3683 cm^{-1} . Cette signature correspond en partie au spectre de référence du galactose mais il manque la bande présente à 3608 cm^{-1} . Or cette référence est constituée de la signature IR des deux anomères α et β du galactose, et dans le cas où la configuration de la liaison glycosidique serait maintenue lors de la fragmentation, le spectre IR du fragment C ne contiendrait uniquement que la signature IR de l'anomère β . Un moyen expérimental pour obtenir le spectre IR d'une seule des deux configurations consiste à réaliser une méthylation de l'ose sur sa position anomérique afin d'obtenir distinctement les méthyl- α -galactose et méthyl- β -galactose. Les spectres IRMPD de ces deux références sont représentés sur la figure 33, entre 3500 et 3700 cm^{-1} . Ces molécules étant méthylées, la bande du mode d'élongation d'OH(1) à 3658 cm^{-1} n'est plus présente et est grisée sur la figure 33. Le spectre du méthyl- α -galactose est composé de nombreux maxima locaux dans cette région à 3561, 3574, 3606, 3626, 3639, 3665 et 3683 cm^{-1} . Celui du méthyl- β -galactose est beaucoup plus simple et est uniquement composé de cinq maxima locaux à 3562 et 3579, 3641, 3662 et 3683 cm^{-1} . La bande du spectre IR du galactose à 3608 cm^{-1} est donc spécifique de sa forme α , ce qui explique son absence dans la signature IR du fragment C. Celui-ci est identifié comme un galactose de configuration β ce qui correspond à la nature de l'ose en position non réductrice de la *N*-acétyl lactosamine.

Lors de la fragmentation d'un disaccharide, la configuration de la liaison glycosidique est conservée dans le fragment C, ce qui permet donc de déterminer la nature de l'ose et la configuration de la liaison. L'identification de la forme anomérique nécessite toutefois l'utilisation de références méthylées ou éventuellement l'apport de spectres IR théoriques lorsqu'il n'est pas possible d'obtenir des références méthylées.

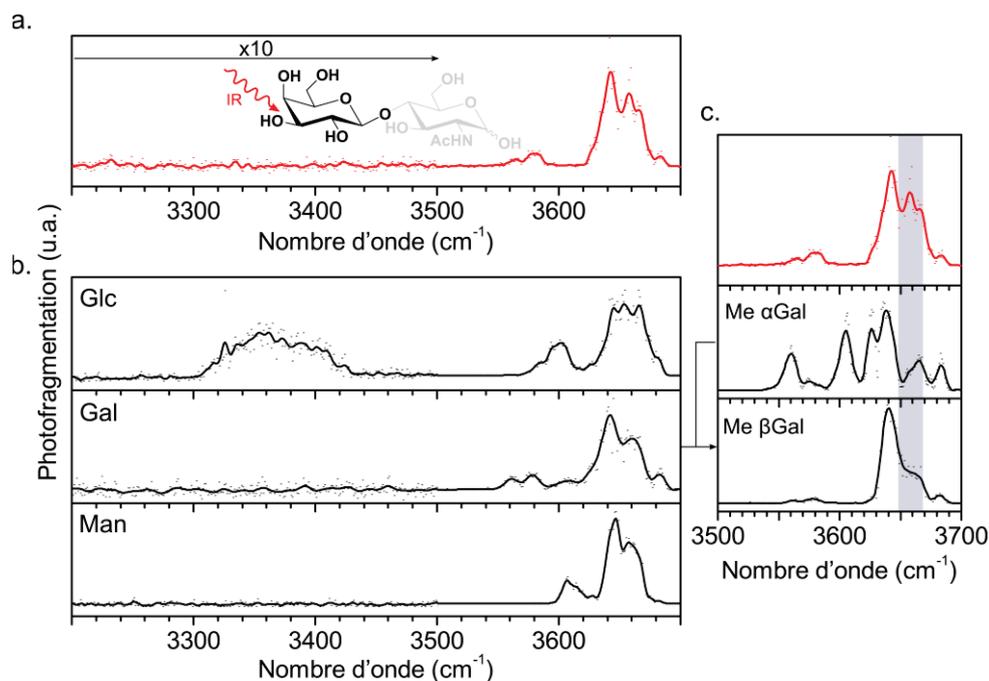


Figure 33 : spectre IRMPD du fragment C de la *N*-acétyl lactosamine (a) comparé aux spectres de référence des hexoses (b) ainsi qu'aux méthyl α - et β -galactose (c). La bande grisée à 3658 cm⁻¹ correspond au mode d'élongation de OH(1) qui est absent sur les méthyl α - et β -galactose puisque méthylé.

3.3. Fragment B

Lors de la rupture de la liaison glycosidique par fragmentation, deux types d'ions sont observés. Comme vu précédemment pour un disaccharide, les fragments C et Y obtenus sont des oses intacts ayant conservé leur conformation adoptée en phase gazeuse, tandis que les fragments B et Z quant à eux résultent d'un réarrangement moléculaire avec perte d'une molécule d'eau. Le fragment B correspond, dans le cas d'un disaccharide, à l'ose non réducteur ayant perdu, au niveau de son carbone 1, une molécule d'eau.

Le fragment B n'étant pas présent sur le spectre MS/MS de la *N*-acétyl lactosamine protonée, un autre disaccharide est choisi pour étudier ce fragment : le 4-O-[2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl]-D-galactopyranose. Son spectre MS/MS est représenté sur figure 34.

Ce disaccharide a également un m/z de 384 et forme lors de sa fragmentation des ions similaires à ceux observés pour la *N*-acétyl lactosamine mais avec des rapports d'intensité différents. Le disaccharide avec une perte d'eau est observé à $m/z = 366$ et un ion correspondant à la *N*-acétyl glucosamine est présent à $m/z = 222$ et ses équivalents déshydratés sont observés à $m/z = 204, 186$ et 168.

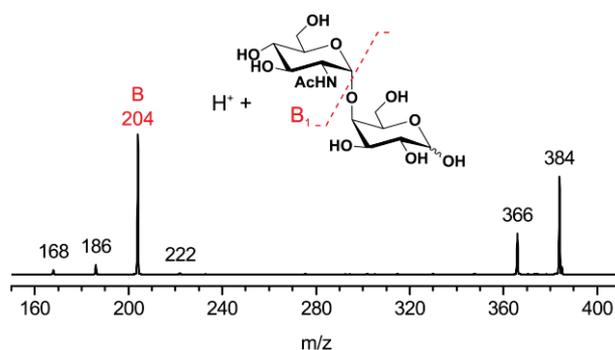


Figure 34 : Spectre MS/MS du 4-O-[2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl]-D-galactopyranose. CID : 16 % / isolation : 30 ms

Le fragment B de $m/z = 204$ du 4-O-[2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl]-D-galactopyranose est donc isolé et son spectre IRMPD est réalisé et représenté en figure 35. Ce spectre est composé de deux régions d'intérêt, entre 2800 et 3000 cm^{-1} , où sont observés les modes d'élongation CH, et entre 3400 et 3700 cm^{-1} , où les bandes NH et OH sont présentes décrivant un motif complexe avec deux bandes principales, à 3455 et 3664 cm^{-1} . Aucune fragmentation n'est observée entre 3000 et 3400 cm^{-1} , suggérant qu'il n'y a pas de liaisons intramoléculaires fortes.

Les *N*-acétyl hexosamines perdent facilement une molécule d'eau par CID ce qui donne une masse équivalente à celle d'un fragment B d'un disaccharide composé d'une *N*-acétyl hexosamine en position non réductrice. Leur spectre IRMPD est représenté sur la figure 35 entre 2700 et 3700 cm^{-1} , et les mêmes régions que pour le fragment B ont été observées. Entre 2800 et 3000 cm^{-1} , un motif de modes d'élongation CH comparable pour chacun des spectres de référence est observé. Dans la région des modes OH/NH, où le motif est complexe, deux bandes principales sont également observées à 3450 et 3664 cm^{-1} pour le fragment de la *N*-acétyl glucosamine, 3455 et 3669 cm^{-1} pour le fragment de la *N*-acétyl galactosamine et 3438 et 3665 cm^{-1} pour le fragment de la *N*-acétyl mannosamine. Le fragment de la *N*-acétyl galactosamine est quant à lui composé de deux bandes résolues supplémentaires à 3528 et 3590 cm^{-1} . Ces trois spectres de référence sont différents, celui de la *N*-acétyl galactosamine est facilement distinguable des deux autres, alors que les spectres IRMPD de la *N*-acétyl galactosamine et *N*-acétyl mannosamine ne diffèrent uniquement que par la position de la bande NH. Le spectre IR du fragment B du 4-O-[2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl]-D-galactopyranose est composé d'une bande NH à 3450 cm^{-1} , tout comme le fragment de la *N*-acétyl glucosamine. La nature du fragment B est identifiée : c'est bien une *N*-acétyl glucosamine.

Pour un disaccharide, la nature de l'ose est préservée dans le fragment B et permet d'identifier la nature de l'ose en position non réductrice. Il n'apporte toutefois pas d'informations supplémentaires comparé au fragment C, en particulier la configuration de la liaison glycosidique.

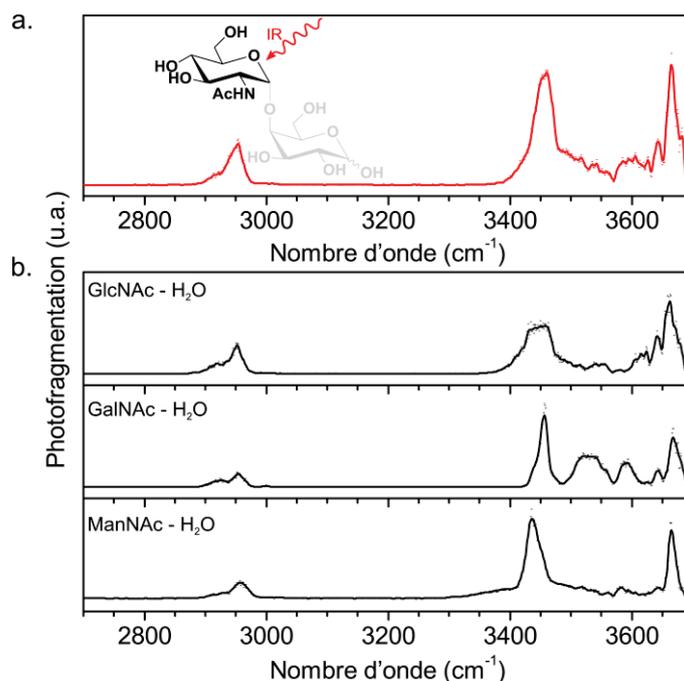


Figure 35 : spectre IRMPD du fragment B du 4-O-[2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl]-D-galactopyranose (a) comparé aux spectres de référence des $[\text{HexNAc} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ (b)

3.4. Fragment Z

Les deux oses constituant la *N*-acétyl lactosamine ont été identifiés, ainsi que la configuration de la liaison glycosidique grâce aux fragments Y et C. Par contre, la position de la liaison glycosidique reste inconnue pour le moment. Sur le spectre MS/MS de la *N*-acétyl lactosamine, figure 30, un deuxième ion d'intérêt est retrouvé à $m/z = 204$ et correspond au fragment Z. Selon la nomenclature Domon & Costello, celui-ci est identifié soit comme étant l'ose en position réductrice ayant perdu une molécule d'eau au niveau de l'oxygène impliqué dans la liaison glycosidique soit comme étant une refragmentation du fragment Y avec perte d'eau au niveau de son carbone 1. (non représenté sur la figure 29)

Ce fragment Z de la *N*-acétyl lactosamine est isolé pour réaliser son spectre IRMPD et celui-ci est représenté entre 2700 et 3700 cm⁻¹ sur la figure 36. Ce spectre est composé d'une région de modes d'élongation CH entre 2800 et 3000 cm⁻¹ et d'une région entre 3400 et 3700 cm⁻¹ contenant deux bandes principales, à 3450 et 3664 cm⁻¹, qui encadrent un motif complexe de photofragmentation.

Ce spectre IRMPD est identique à celui du fragment de la *N*-acétyl glucosamine représenté précédemment sur la figure 35, confirmant ainsi que le fragment Z correspond à la refragmentation du fragment Y, avec perte d'eau au niveau du carbone 1. Par la suite, cette fragmentation sera nommée Y/B, car elle correspond à la refragmentation du fragment Y selon la fragmentation de type B. L'information sur la position de la liaison glycosidique n'est pas obtenue grâce à ce fragment, et l'étude

à elle seule des monosaccharides ne permet pas d'obtenir toutes les informations nécessaires au séquençage d'un oligosaccharide.

La configuration de la liaison glycosidique est obtenue avec le spectre IRMPD du fragment C, et la nature des différents constituants peut être déterminée grâce aux fragments conservant l'ose (fragments C et Y) mais également grâce aux fragments ayant perdu une molécule d'eau (fragments B et Y/B) dans le cas où leur équivalent intact ne serait pas observé sur le spectre MS/MS ou en trop faible quantité. Finalement, pour obtenir toutes les informations nécessaires au séquençage d'un oligosaccharide, il est indispensable de réaliser les spectres des disaccharides le composant puisque leur signature infrarouge est spécifique de la position de la liaison glycosidique, comme vu sur la figure 26.

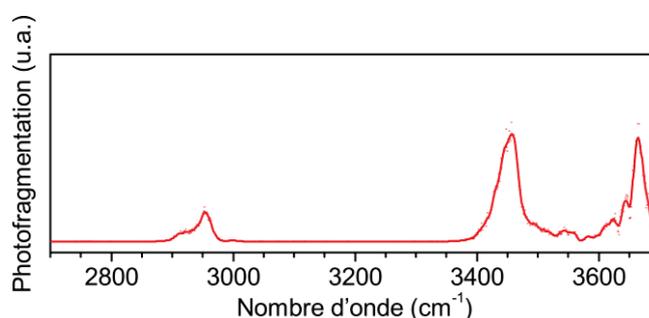


Figure 36 : spectre IRMPD du fragment Z de la *N*-acétyl lactosamine

3.5. Principe du séquençage par MSⁿ/IR

Le couplage de la spectrométrie de masse avec la spectroscopie IR permet d'obtenir toutes les informations nécessaires au séquençage d'un oligosaccharide. Les informations sur la nature des constituants et la configuration de la liaison glycosidique sont conservées lors de la fragmentation en oses. L'information sur la nature de l'ose est obtenue indifféremment par les fragments B, C, Y ou Y/B alors que la configuration de la liaison glycosidique ne peut être obtenue que par les fragments C. L'analyse de l'oligosaccharide à partir de ses disaccharides constitutifs permet d'obtenir la position de la liaison glycosidique ainsi que sa composition en oses.

Pour identifier un oligosaccharide à *X* oses, il est nécessaire de réaliser *X* séquences MSⁿ afin d'obtenir tous les oses constitutifs de celui-ci. Pour obtenir les disaccharides qu'il contient, il faut réaliser *X*-1 séquences MSⁿ. Pour chacun des fragments obtenus, un spectre IR est réalisé et comparé à une base de données de spectres IR de référence. Un score de correspondance[20] est calculé pour chacun des spectres IR des références ayant le même rapport *m/z* et est défini comme :

$$score = 999 \times \left(1 - \sqrt{\frac{\sum_i^n (P_i^{ref} - P_i^{exp})}{n}} \right)$$

Où n correspond au nombre de points qui constituent le spectre IRMPD, P^{ref} et P^{exp} correspondent respectivement aux taux de photofragmentation observés sur les spectres IRMPD de la référence et de l'expérience.

Une fois chaque fragment identifié, il est alors possible de retrouver la structure initiale de l'oligosaccharide. Pour obtenir une couverture complète de séquence, il peut être nécessaire d'utiliser différents états de charges : protoné, déprotoné, adduit chargé, doublement chargé.

4. Application à l'identification d'un oligosaccharide

Comme vu précédemment, le couplage de la spectrométrie de masse avec la spectroscopie infrarouge permet de discriminer des disaccharides différents. Lorsque l'on s'intéresse à des oligosaccharides de plus grande taille, le nombre d'hydroxyles augmente, provoquant plus facilement des liaisons hydrogènes qui élargissent les bandes observées sur le spectre IRMPD et entraînent une perte de résolution. Les capacités de ce couplage sont mises à l'épreuve par l'étude de deux chitosans.

Les chitosans sont des oligosides composés de 4-5 unités de type *N*-acétyl glucosamine reliées entre elles par des liaisons glycosidiques β 1,4. Ce sont des dérivés de la chitine qui est un polymère très abondant dans la nature puisqu'il constitue la cuticule des insectes et des crustacés. Les chitosans sont plus ou moins dé-*N*-acétylés ce qui leur donne des propriétés spécifiques.[21] Il est donc intéressant de pouvoir obtenir des structures dont la localisation des acétylations est parfaitement définie[22] mais dans certains cas, la position de la glucosamine dans l'oligosaccharide est difficile à déterminer, même par RMN.[23] L'utilisation de la spectrométrie de masse couplée à la spectroscopie infrarouge est une alternative prometteuse pour identifier la position de la glucosamine dans la séquence de l'oligoside.

La figure 37 représente les spectres IR de deux tétrasaccharides composés de trois *N*-acétyl glucosamine et une hexosamine mais ayant une séquence différente. Les spectres IR entre 2700 et 3700 cm^{-1} de ces deux oligosides ont en commun la région CH avec des modes d'élongation à 2885 et 2945 cm^{-1} et une bande d'élongation d'un mode OH à 3645 cm^{-1} . Toutefois, il est possible de les différencier grâce à leur motif de bandes NH et OH liés compris entre 3000 et 3600 cm^{-1} .

La spectrométrie de masse couplée à la spectroscopie infrarouge permet de différencier des tétrasaccharides de même masse. Toutefois, il est nécessaire pour identifier la localisation de la

glucosamine dans la séquence, soit de comparer le spectre obtenu à un spectre de référence, mais pour cela il est nécessaire d'avoir de nombreuses références purifiées, soit d'être capable de séquencer l'oligoside en le fragmentant et en comparant les fragments obtenus à un nombre réduit de spectres de référence. Dans ce cas, plus il est possible d'obtenir d'informations à partir de petits fragments, moins il est nécessaire de posséder une base de données de spectres de référence conséquente.

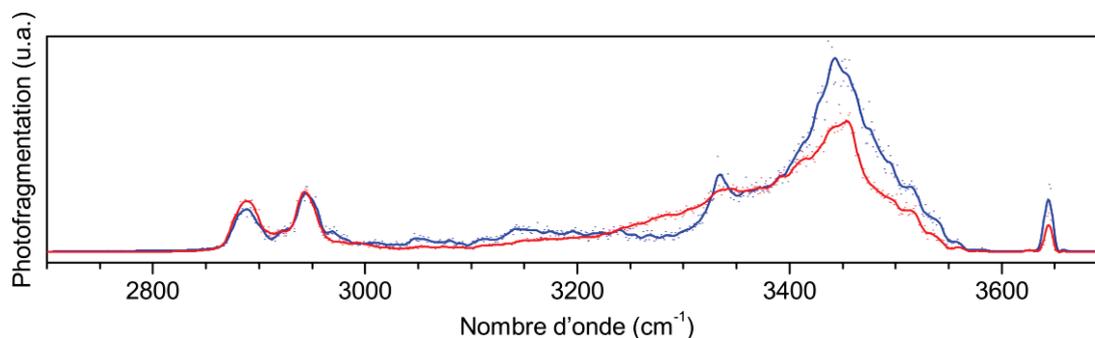


Figure 37 : Spectre IR de deux tétrasaccharides contenant trois *N*-acétyl glucosamine et une glucosamine en position non réductrice (bleu) et sur le deuxième monosaccharide en partant de la position non réductrice (rouge)

4.1. Séquençage d'un tétrasaccharide de chitosan

Un échantillon d'un tétrasaccharide de *N*-acétyl glucosamines liées en β 1,4 et d'une glucosamine a été obtenu et préparé par Dr Sébastien Fort du CERMAV selon la procédure décrite dans la référence [23]. La méthode de séquençage couplant spectrométrie de masse et spectroscopie infrarouge a été utilisée afin de confirmer la nature des résidus, la position et la configuration de la liaison glycosidique et d'identifier la position de la glucosamine dans la séquence de l'oligoside.

Le spectre de masse d'une solution à 250 μ M du tétrasaccharide dans un mélange eau/méthanol (50/50) est représenté en figure 38. Deux ions sont principalement observés à $m/z = 789$ et $m/z = 811$ et correspondent respectivement au tétrasaccharide protoné et complexé avec un sodium. Le rapport m/z de 789 confirme la taille de l'oligoside à étudier : il est bien constitué de trois *N*-acétyl hexosamines et d'une hexosamine.

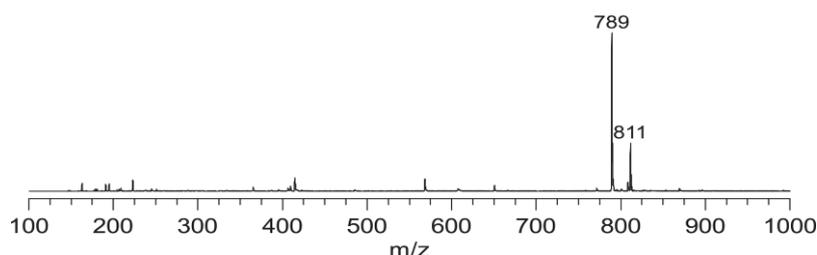


Figure 38 : Spectre de masse du tétrasaccharide de chitosan

4.1.1. Analyse des constituants : les monosaccharides

4.1.1.1. MS^n

Pour obtenir tous les oses contenus dans le tétrasaccharide, il faut réaliser quatre séquences MS^n qui permettent d'isoler chacun des constituants. Lors de la séquence MS/MS, le tétrasaccharide est fragmenté en deux par rupture d'une des trois liaisons glycosidiques avec conservation ou non d'un hydroxyle en position 1 lors de la rupture de la liaison glycosidique, selon les deux possibilités reportées dans la nomenclature Domon & Costello.

Le spectre MS/MS du tétrasaccharide de chitosan est représenté en figure 39. L'ion parent est observé à $m/z = 789$, le fragment majoritaire à $m/z = 568$ et deux ions utiles pour le séquençage en oses sont présents à $m/z = 180$ et 204 , mais de faible intensité. Ces deux derniers correspondent à la fragmentation d'une extrémité réductrice ou non réductrice : une fragmentation C ou Y d'une hexosamine ($m/z = 180$) et une fragmentation B ou Y/B d'une *N*-acétyl hexosamine ($m/z = 204$). Le fragment de $m/z = 365$ correspond à un disaccharide contenant une hexosamine et une *N*-acétyl hexosamine avec perte d'une molécule d'eau et enfin, le fragment majoritaire de $m/z = 568$ correspond à un trisaccharide contenant trois *N*-acétyl hexosamines et une hexosamine, avec une perte d'eau.

Le spectre MS/MS permet d'identifier deux possibilités pour la séquence en oses. En effet la présence des deux familles d'oses, hexosamine à $m/z = 180$ et *N*-acétyl hexosamine à $m/z=204$, dans le spectre MS/MS indique que l'hexosamine se trouve à l'une des extrémités du tétrasaccharide. La présence du fragment de $m/z = 365$ correspondant à un disaccharide déshydraté contenant une hexosamine et une *N*-acétyl hexosamine permet d'identifier l'oligosaccharide comme étant linéaire, et exclut la présence de ramifications. Deux séquences, représentées en figure 39, sont alors possibles pour le tétrasaccharide afin d'avoir l'hexosamine à l'une des extrémités de l'oligosaccharide : HexNAc (d)-HexNAc (c)-HexNAc (b)-HexN (a) ou HexN (a)-HexNAc (b)-HexNAc (c)-HexNAc (d).

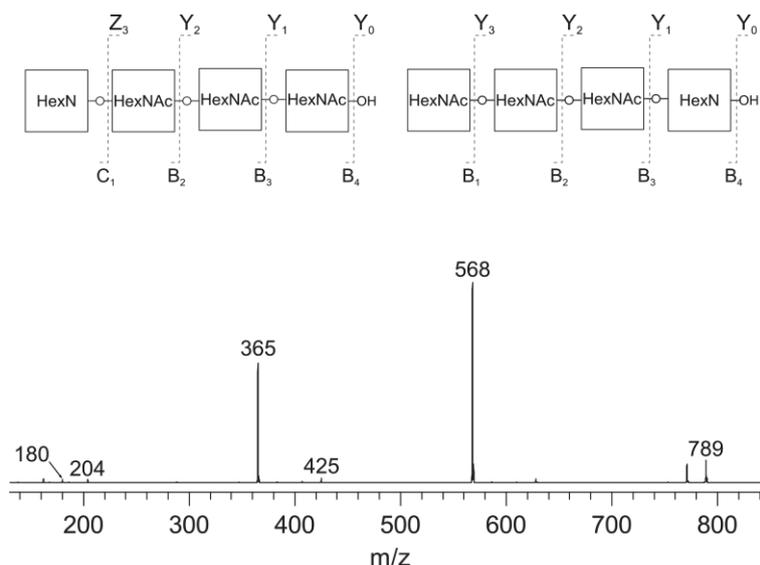


Figure 39 : spectre MS/MS du tétrasaccharide protoné de $m/z = 789$. CID : 20% / isolation : 30 ms

À partir du fragment de $m/z = 568$, il est possible d'obtenir trois des séquences d'intérêt pour l'analyse de l'oligosaccharide. Comme le montre le spectre de masse représenté sur la figure 40, le fragment de $m/z = 568$ se dissocie en trois ions d'intérêt : $m/z = 383$, $m/z = 365$ et $m/z = 204$. Ils correspondent respectivement à un disaccharide composé d'une *N*-acétyl hexosamine et d'une hexosamine, à son équivalent déshydraté, et à une *N*-acétyl hexosamine déshydratée. Cette *N*-acétyl hexosamine déshydratée correspond au résidu (c) du tétrasaccharide. Par une étape supplémentaire de fragmentation sur les deux disaccharides, il est possible d'obtenir un fragment correspondant à une hexosamine pour le résidu (a) et à une *N*-acétyl hexosamine pour le résidu (b).

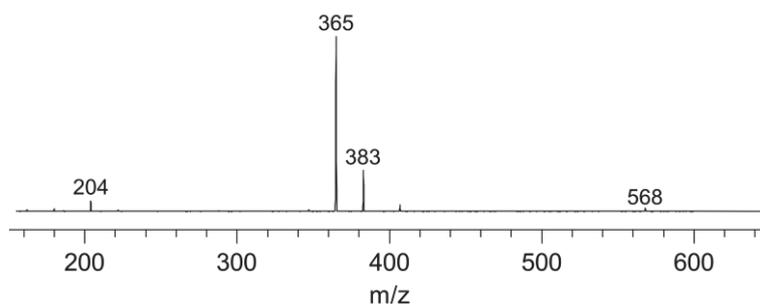


Figure 40 : Spectre MS³ du tétrasaccharide de chitosan, isolation $m/z = 789$ CID : 20% puis isolation $m/z = 568$ CID : 20%

Le fragment de la *N*-acétyl hexosamine situé à l'une des extrémités n'est présent que sous forme déshydratée dans le spectre MS/MS. Pour l'obtenir sous sa forme complète, il est nécessaire d'utiliser un autre état de charge. Le spectre de fragmentation de l'espèce doublement chargée à $m/z = 395$ est représenté sur la figure 41 et en fragmentant le tétrasaccharide sous cet état de charge, il est possible d'obtenir en quantité suffisante la *N*-acétyl hexosamine (résidu (d)) située à l'une des extrémités.

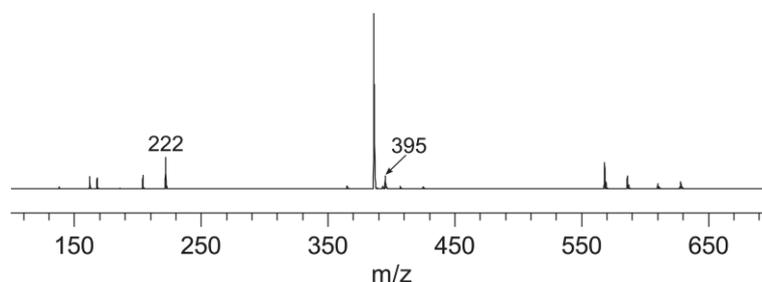


Figure 41 : Spectre MS/MS du tétrasaccharide de chitosan doublement protoné ($m/z=395$)

Les résidus (a), (b), (c) et (d) sont obtenus par différentes séquences MS^n , et en utilisant différents états de charge. Toutefois, il n'a pas été possible d'obtenir le résidu (c) entier, seul son équivalent déshydraté a été obtenu.

4.1.1.2. MS^n/IR

Les spectres IRMPD de chacun des résidus identifiés lors des différentes séquences MS^n ont été réalisés et comparés avec une base de données pour leur identification. Les spectres IR sont reportés entre 2700 et 3700 cm^{-1} en figure 42 avec le score de correspondance obtenu avec chacune des molécules pertinentes de la base de données. Cette comparaison a permis d'obtenir la nature de chacun des résidus du tétrasaccharide. L'hexosamine est identifiée comme une glucosamine et les trois *N*-acétyl hexosamines correspondent à des *N*-acétyl glucosamine. La comparaison à l'aide du score permet une identification rapide de la nature des résidus.

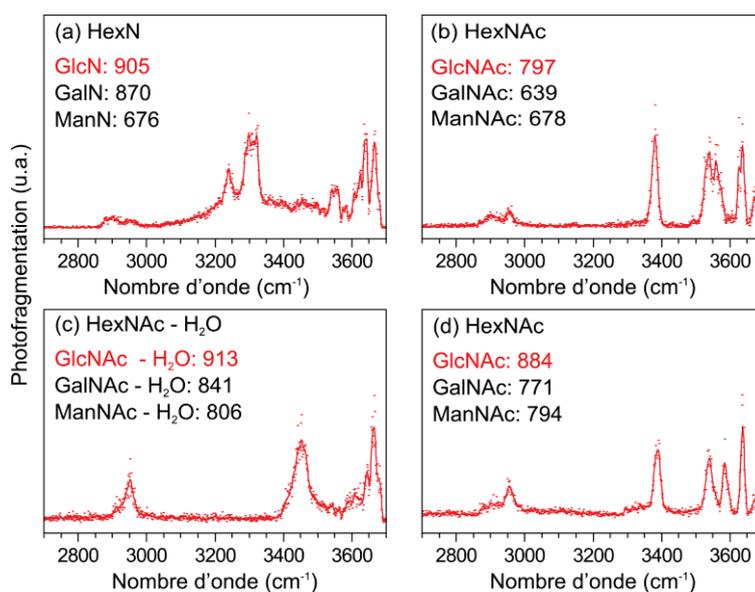


Figure 42 : Spectres IR des différents résidus obtenus par MS^n

Toutefois, les spectres des résidus (a) et (b) sont différents de leurs références expérimentales présentées précédemment sur la figure 19 et la figure 21. Ceci s'explique car ces fragments étaient

impliqués dans des liaisons glycosidiques et ont donc conservé la stéréochimie de l'hydroxyle en position 1 alors que les références sont constituées d'un mélange α/β .

L'identification de la forme anomérique pour le résidu (a) est réalisée comme pour l'exemple du fragment C de la *N*-acétyl lactosamine. Les spectres IR du résidu (a), et des anomères α et β méthylés de la glucosamine sont représentés entre 3100 et 3400 cm^{-1} en figure 43. Le spectre IR du résidu (a) correspond uniquement à une partie du spectre IR de la glucosamine et sa comparaison avec les spectres des espèces méthylés de la glucosamine montre que le signal obtenu provient de l'anomère β . Le spectre IR du résidu (a) est composé dans la région NH d'une bande à 3238 cm^{-1} et de deux bandes peu résolues 3298 et 3320 cm^{-1} , celui de l'anomère α méthylé en position 1 montre deux bandes NH à 3254 et 3343 cm^{-1} et l'anomère β méthylé en position 1 comporte quant à lui, trois bandes NH à 3241, 3300 et 3318 cm^{-1} . Le résidu (a) est identifié comme l'anomère β de la glucosamine, car il possède les trois bandes caractéristiques des modes d'élongation NH observées sur le spectre IR de référence de la méthyl- β -D-glucosamine.

De même pour identifier la configuration de la liaison du résidu (b), le spectre IR de celui-ci est comparé aux spectres IR des anomères α et β méthylés de la *N*-acétyl glucosamine en figure 43. Les régions CH et NH ne permettent pas d'identifier les deux anomères, toutefois la différence se fait au-dessus de 3500 cm^{-1} . Le spectre IR du résidu (b) est composé de deux bandes rapprochées à 3536 et 3561 cm^{-1} , d'une bande à 3633 cm^{-1} attribuée à l'hydroxyle en position 1 car absente dans les références méthylées et enfin d'une bande à 3675 cm^{-1} . Le spectre IR de la méthyl- β -D-glucosamine est composé dans la région OH de deux bandes rapprochées à 3537 et 3560 cm^{-1} ainsi que d'une bande à 3670 cm^{-1} . Enfin, le spectre IR de la méthyl- α -D-glucosamine est lui composé dans la région OH de deux bandes plus espacées à 3539 et 3587 cm^{-1} ainsi que d'une bande à 3670 cm^{-1} . Les deux bandes OH autour de 3550 cm^{-1} sont rapprochées dans le cas de l'anomère β et espacées pour l'anomère α .

Le résidu (b) est identifié comme l'anomère β de la *N*-acétyl glucosamine car le motif des modes OH vers 3550 cm^{-1} est rapproché et ne présente pas de bandes à 3587 cm^{-1} comme l'anomère α .

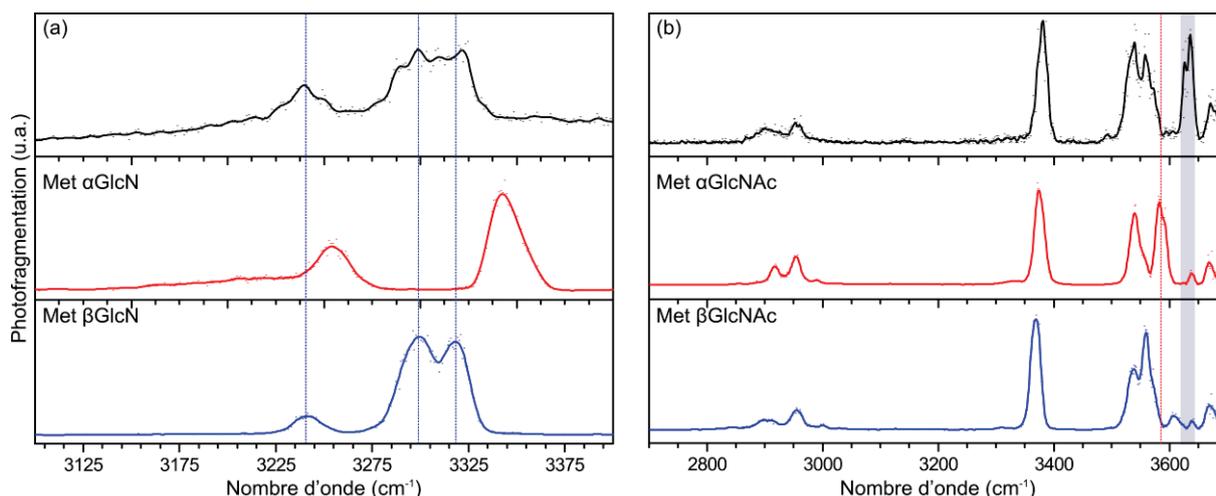


Figure 43 : Spectres IR du résidu (a) et des références α et β méthylés de la glucosamine ainsi que les spectres IR du résidu (b) et des références α et β méthylés de la *N*-acétyl glucosamine.

Pour conclure, le résidu (a) est identifié comme un anomère β de la glucosamine, or il était à l'une des extrémités, cela signifie que le résidu (a) est positionné à l'extrémité non réductrice du tétrasaccharide et est lié en β . De même, le résidu (b) est une *N*-acétyl glucosamine liée en β . Le résidu (c) est attribué à une *N*-acétyl glucosamine mais la stéréochimie de la liaison n'a pas pu être déterminée car seul le fragment Y/B a été observé. Enfin, le résidu (d) est une *N*-acétyl glucosamine et possède un motif OH autour de 3550 cm^{-1} similaire à celui de la référence de *N*-acétyl glucosamine suggérant qu'il est présent à la fois en conformation α et β , et donc qu'il est situé au niveau de l'extrémité réductrice du tétrasaccharide. On obtient alors la nature de chacun des résidus, la séquence et la stéréochimie de la liaison pour deux des trois résidus impliqués dans une liaison. Toutefois, comme les fragments Y/B ne conservent pas la position de la liaison, il est nécessaire de séquencer et identifier les disaccharides pour obtenir la dernière information : celle de la position de la liaison.

4.1.2. Analyse des constituants : les disaccharides

4.1.2.1. MS^n

Pour obtenir tous les disaccharides contenus dans le tétrasaccharide, il est nécessaire de réaliser trois séquences MS^n . Lors du spectre MS/MS , figure 39, seul le disaccharide contenant deux *N*-acétyl glucosamine, correspondant à (c)-(d) est obtenu en quantité suffisante pour réaliser directement son spectre vibrationnel. Pour obtenir les deux autres disaccharides, il est nécessaire de fragmenter l'ion de $m/z=568$ correspondant à (a)-(b)-(c) déshydraté pour obtenir les ions de $m/z=383$ et 407 équivalant respectivement à (a)-(b) entier et (b)-(c) déshydraté.

Ces trois disaccharides permettent d'identifier les trois liaisons glycosidiques contenues dans le tétrasaccharide.

4.1.2.2. MSⁿ/IR

Les spectres IR des différents disaccharides constitutifs de l'oligosaccharide sont représentés entre 2700 et 3700 cm⁻¹ en figure 44 avec les spectres IR de disaccharides de référence et leur score de correspondance.

Les spectres IR des disaccharides (b)-(c) déshydraté et (c)-(d) sont analysés et comparés aux spectres IR de référence du 2-acetamido-2-deoxy-4-O-[2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl]-D-glucopyranose et du 2-acetamido-2-deoxy-6-O-[2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl]-D-glucopyranose déshydratés ou non. Le score de correspondance permet d'identifier le disaccharide (b)-(c) comme étant l'anomère β d'une N-acétyl glucosamine lié en position 4 à une autre N-acétyl glucosamine. Enfin, le disaccharide (c)-(d) est également identifié comme l'anomère β d'une N-acétyl glucosamine lié en position 4 à une autre N-acétyl glucosamine. Le spectre IR du disaccharide (a)-(b) est analysé et comparé au spectre IR de référence du 2-acetamido-2-deoxy-4-O-[2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl]-D-glucopyranose. Le spectre IR de référence et le spectre de (a)-(b) sont identiques mis à part l'absence d'une bande observée à 3450 cm⁻¹ dans le spectre IR de référence.

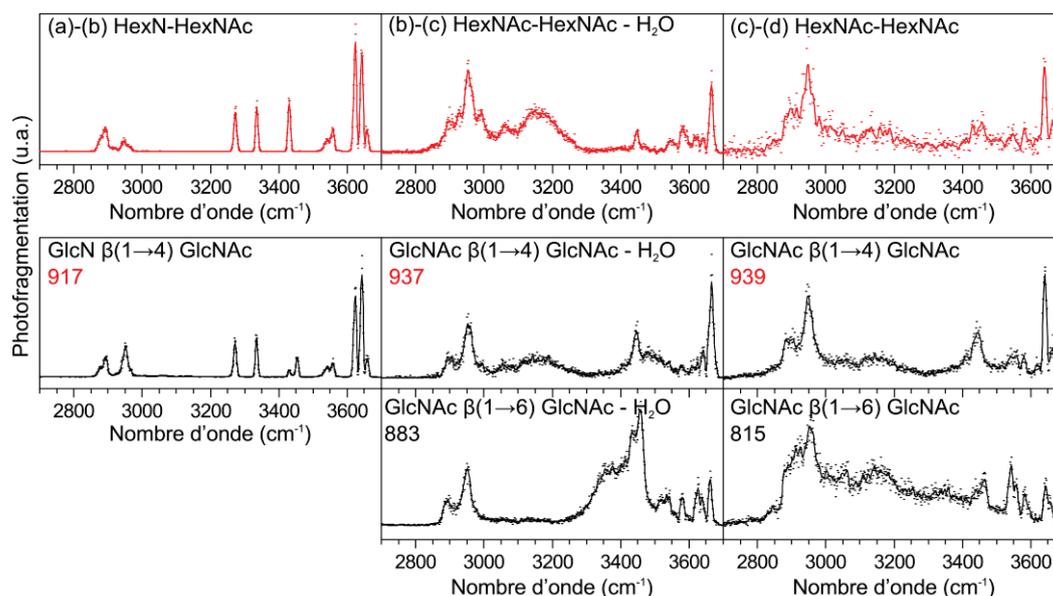


Figure 44 : Spectres IR des disaccharides constitutifs du tétrasaccharide comparés aux spectres de référence correspondant.

Pour identifier cette bande, le spectre IRMPD de la référence du 2-acetamido-2-deoxy-4-O-[2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl]-D-glucopyranose est comparé entre 3200 et 3700 cm⁻¹ aux spectres IR théoriques des anomères α et β de ce disaccharide sur la figure 45. Le spectre expérimental est composé de quatre bandes entre 3200 et 3450 cm⁻¹ correspondant aux modes NH de la molécule, d'une bande à 3550 cm⁻¹ correspondant à un mode d'élongation OH lié et enfin de trois bandes au-dessus de 3600 cm⁻¹ attribuées à des modes OH libres. Pour le spectre IR théorique de l'anomère α, les bandes NH sont observées à 3273, 3337 et 3447 cm⁻¹ et les bandes OH sont observées à 3563, 3626,

3630, 3651 et 3676 cm^{-1} alors que pour celui l'anomère β , celles-ci sont observées à 3267, 3337, 3421 cm^{-1} pour les modes NH et 3562, 3626, 3628, 3667 et 3684 cm^{-1} pour les modes OH. La position des bandes IR théoriques n'est que très légèrement modifiée entre les deux anomères dans cette gamme de nombre d'onde exceptée pour la bande NH de l'acétyle qui est observée entre 3400 et 3450 cm^{-1} . Par comparaison avec la théorie, les deux bandes NH observées expérimentalement entre 3400 et 3450 cm^{-1} sont attribuées aux deux anomères de ce disaccharide, la bande à 3430 cm^{-1} est attribuée à l'anomère β et celle à 3450 cm^{-1} à l'anomère α . Le disaccharide (a)-(b) ne possédant que la bande à 3430 cm^{-1} est donc identifié comme l'anomère β du 2-acetamido-2-deoxy-4-O-[2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl]-D-glucopyranose.

La nature des résidus (a) et (b) et la configuration de leur liaison glycosidique sont confirmées : (a) est l'anomère β de la glucosamine, et (b) est l'anomère β de la *N*-acétyl glucosamine. De plus, la position de la liaison est identifiée : le résidu (a) est lié au résidu (b) en position 4 tout comme les autres résidus.

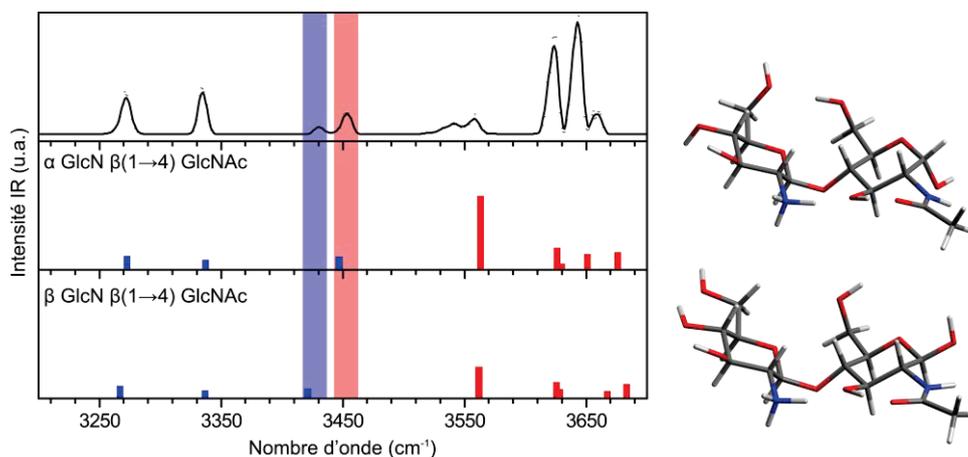


Figure 45 : Spectre IRMPD du 2-acetamido-2-deoxy-4-O-[2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl]-D-glucopyranose ainsi que les spectres IR théoriques obtenus par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd) des anomères α et β . Les modes d'élargissement NH sont colorés en bleu et les modes d'élargissement OH en rouge.

Les différents disaccharides ont été identifiés, et ces résultats confirment ceux obtenus par l'analyse des oses tout en ajoutant l'information sur la position de la liaison et sa configuration lorsque celle-ci manquait. Ceci permet ainsi de déterminer la structure du tétrasaccharide comme étant : GlcN β (1 \rightarrow 4) GlcNAc β (1 \rightarrow 4) GlcNAc β (1 \rightarrow 4) GlcNAc.

4.2. Exemples d'applications du séquençage

4.2.1. Mélange de chitosans

Bien qu'il soit possible de séquencer entièrement un oligosaccharide, dans certains cas, une seule information est nécessaire en complément de la spectrométrie de masse. Dans certains lots de production de chitosans, différentes tailles du polymère peuvent être présentes et il est intéressant

d'identifier rapidement la position de la dé-acétylation en supposant le squelette (GlcNAc β 1,4)_n connu. Le spectre de masse d'un échantillon de chitosans est présenté en figure 46a et permet rapidement de confirmer la présence de dp4 et de dp5 de chitosans, c'est-à-dire d'une masse correspondant à un tétrasaccharide constitué de trois *N*-acétyl hexosamines et une hexosamine et d'un pentasaccharide constitué de quatre *N*-acétyl hexosamines et une hexosamine. Le spectre MS/MS de chacun de ces oligosaccharides est représenté en figure 46b. Dans le cas du dp4, deux fragments caractéristiques de la présence de l'hexosamine à l'une des extrémités sont observés à $m/z = 180$, ce qui correspond à une hexosamine et à $m/z = 628$, ce qui correspond à un trisaccharide composé de trois *N*-acétyl glucosamines. De même pour le dp5 où est observé à $m/z = 180$ et à 831 une hexosamine et un tétrasaccharide de *N*-acétyl glucosamines. Toutefois ces fragments diagnostiques ne permettent pas de dire si l'hexosamine est à l'extrémité réductrice ou non réductrice.

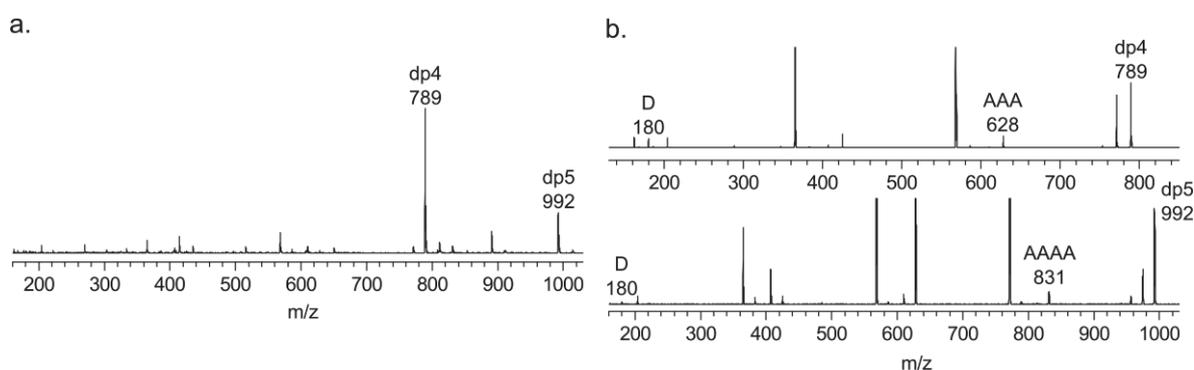


Figure 46 : Spectre de masse d'un échantillon de chitosans (a) ainsi que les spectres MS/MS des dp4 et dp5 (b). A correspond à une *N*-acétyl hexosamine et D à une hexosamine

Les spectres IRMPD de l'hexosamine obtenue par fragmentation des dp4 et dp5 de chitosans sont représentés en figure 47 et sont comparés aux spectres IRMPD des références méthylées des anomères α et β de la glucosamine comme vu précédemment. Trois bandes sont observées sur les spectres à 3238, 3292 et 3314 cm^{-1} pour l'hexosamine du dp4 et à 3236, 3294 et 3319 cm^{-1} pour l'hexosamine du dp5. Ces trois bandes correspondent aux bandes NH caractéristiques de la forme β de la glucosamine et sont observées à 3241, 3297 et 3318 cm^{-1} dans le cas de la forme β méthylée. Ceci permet d'identifier la position de la glucosamine sur l'oligosaccharide, celle-ci se trouve à l'extrémité non réductrice.

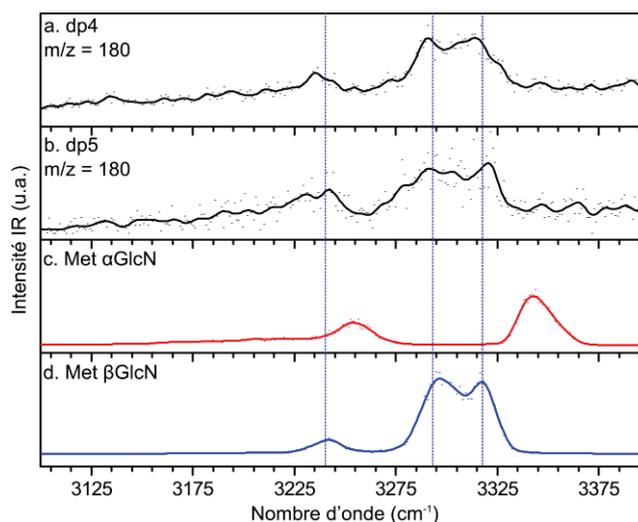


Figure 47 : Spectres IRMPD de l'hexosamine contenu dans le dp4 (a) et dans le dp5 (b) comparés aux références méthylées des anomères α (c) et β (d) de la glucosamine

4.2.2. GAGs : identification de l'acide hexuronique

Les glycosaminoglycanes sont des polysaccharides linéaires présents chez les mammifères[24] dont l'unité répétitive est constituée d'un acide hexuronique lié à une hexosamine ou *N*-acétyl hexosamine. Pour moduler l'activité biologique de ces polymères, ils sont sulfatés à différentes positions, et l'identification de ces positions par la méthode de séquençage MS/IR sera présentée dans le chapitre III. Ils peuvent également subir sous l'effet d'épimérasés une modification de la nature de leur acide hexuronique leur donnant plus de flexibilité.[25]

Le tétrasaccharide d'acide hyaluronique représenté sur la figure 48a est un standard acheté chez Iduron de séquence connue $\Delta\text{HexA } \beta 1,3\text{-GlcNAc } \beta 1,4\text{-GlcA } \beta 1,3\text{-GlcNAc}$ où l'acide hexuronique en position non réductrice présente une insaturation entre C4-C5 et une perte de l'hydroxyle en C4. Cette modification est liée à l'utilisation d'enzymes lors de la production de ce standard. Il a été utilisé afin de tester les performances de notre méthode de séquençage pour l'identification de la nature de l'acide hexuronique. Cet échantillon est solubilisé dans un mélange eau/acétonitrile (50/50) à une concentration de 26 μM et les conditions de source sont optimisées sur le signal du tétrasaccharide déprotoné une seule fois et observé à $m/z = 757$ sur la figure 48a. À noter que l'ion doublement déprotoné est également présent sur le spectre de masse à $m/z = 378$. Par fragmentation de l'ion de $m/z = 757$, deux ions sont obtenus comme représenté sur la figure 48b. Un ion majoritaire à $m/z = 554$ qui correspond à un trisaccharide : l'ion C_3 ($\Delta\text{HexA } \beta 1,3\text{-GlcNAc } \beta 1,4\text{-GlcA}$) et un ion de très faible intensité à $m/z = 396$ identifié comme étant un disaccharide : l'ion Y_2 ($\text{GlcA } \beta 1,3\text{-GlcNAc}$). Ce dernier est alors isolé et par fragmentation libère l'acide hexuronique à $m/z = 193$.

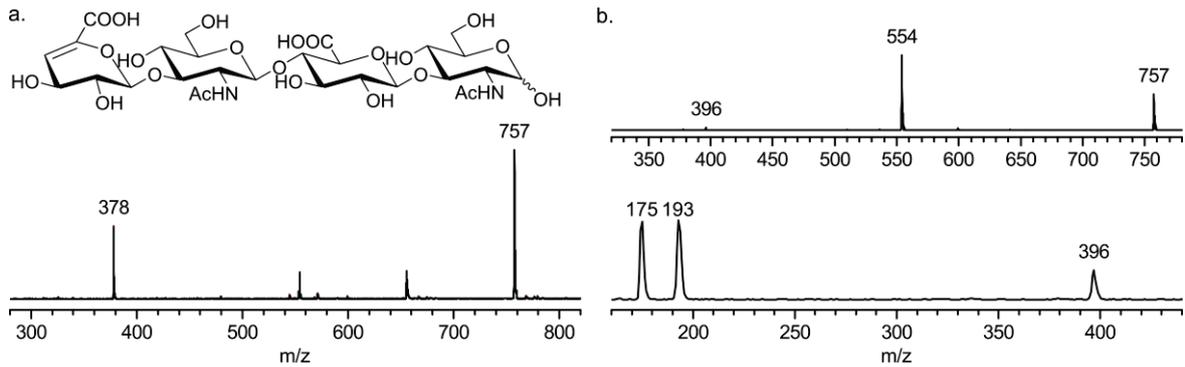


Figure 48 : spectre de masse d'un tétrasaccharide d'acide hyaluronique (a) et les spectres de fragmentation de celui-ci permettant d'obtenir un acide hexuronique complet

Le spectre IRMPD de ce fragment est représenté figure 49 et comparé aux spectres IRMPD de référence de l'acide D-glucuronique et L-iduronique décrit précédemment. Le spectre obtenu est composé de deux bandes dans la région CH à 2804 et 2872 cm^{-1} et d'un motif étendu de bandes liées centré autour de 3330 cm^{-1} mais ne possède pas de bandes OH à 3585 cm^{-1} . Ce spectre IRMPD est clairement identifié comme correspondant à celui de l'acide D-glucuronique ce qui est en accord avec la séquence donnée par le fournisseur de cette molécule.

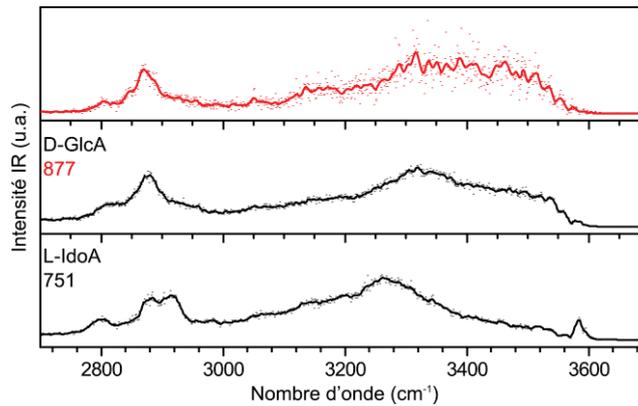


Figure 49 : Spectre IRMPD du fragment de $m/z = 193$ provenant du tétrasaccharide d'acide hyaluronique (rouge) ainsi que les spectres IRMPD de référence de l'acide D-glucuronique et de l'acide L-iduronique (noir)

La méthode de séquençage par MS/IR permet d'identifier totalement les oligosaccharides mais peut également être utilisée pour répondre rapidement à des questions spécifiques et en ne réalisant que le spectre IRMPD nécessaire :

- Où se trouve la glucosamine dans un oligosaccharide de chitosan ?
- Quelle est la nature de l'acide hexuronique dans le cas des glycosaminoglycanes ?

4.3. Perspectives et conclusions

La spectrométrie de masse couplée à la spectroscopie infrarouge permet la différenciation des oses des différentes familles, avec la possibilité d'utiliser une variété d'états de charge : protoné, adduit ou

déprotoné. Cette méthode couplée n'est pas limitée à l'étude des oses, il est possible de différencier des disaccharides potentiellement très semblables. La sensibilité de cette méthode a été démontrée sur différents disaccharides et pour chacun, un spectre vibrationnel unique a été obtenu. Le couplage est sensible à la nature des constituants du disaccharide, à la position et à la configuration de la liaison glycosidique ainsi qu'à la séquence entre les deux constituants.

Il est même possible avec le couplage de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie vibrationnelle, de différencier des tétrasaccharides qui ne diffèrent que par la position du résidu de glucosamine dans une séquence de *N*-acétyl glucosamine grâce à leur spectre IRMPD. En revanche, peu d'information sur la structure et la composition du tétrasaccharide est obtenue à partir de leur spectre IRMPD et le recours à la comparaison à des spectres de référence est nécessaire pour identifier ces tétrasaccharides directement. Le recours au séquençage apparaît donc clairement.

La fragmentation par spectrométrie de masse des oligosaccharides est très étudiée et permet d'obtenir des informations sur la structure globale de ceux-ci. Nous avons démontré dans ce chapitre que le couplage à la spectroscopie infrarouge permet d'obtenir des détails sur la nature, la configuration de la liaison glycosidique et la position de la liaison glycosidique à partir des fragments. L'information sur la nature et la configuration de la liaison glycosidique sont conservées par les fragments C. Le spectre IRMPD du fragment Y_1 est composé du mélange des anomères α et β selon le ratio retrouvé en solution, permettant ainsi d'identifier le résidu à l'extrémité réductrice. À noter que la nature de l'ose peut également être obtenue par le fragment B, c'est-à-dire l'ose ayant perdu une molécule d'eau en position anomérique. Enfin, le fragment Z selon la nomenclature de Domon et Costello est identifié comme étant en réalité un fragment Y ayant été refragmenté avec perte d'eau en position anomérique empêchant ainsi d'obtenir l'information sur la position de la liaison glycosidique par l'étude des oses constitutifs. Il est alors nécessaire d'utiliser les disaccharides pour obtenir l'information sur la position de la liaison glycosidique.

Ces différents éléments ont permis la mise au point d'une méthode de séquençage grâce au couplage de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie infrarouge et le schéma de la figure 50 représente les différentes étapes du séquençage d'un oligosaccharide. La première étape consiste à fragmenter séquentiellement l'oligosaccharide afin d'obtenir les différents monosaccharides et disaccharides le composant. Ensuite, chacun des fragments est isolé afin de réaliser son spectre IRMPD. Puis par comparaison entre le spectre IRMPD réalisé et une base de données de référence sur les monosaccharides ou les disaccharides, les fragments sont identifiés. Cette base de données est constituée des spectres IRMPD de référence obtenus pour des monosaccharides et des disaccharides standard, et dans les conditions expérimentales décrites lors du chapitre I. Enfin, en utilisant toutes

ces informations, il est possible de déterminer la structure de l'oligosaccharide. Par ailleurs, la base de données réalisée au laboratoire contient actuellement une quarantaine de références de monosaccharides et de disaccharides, et celle-ci est continuellement étendue.

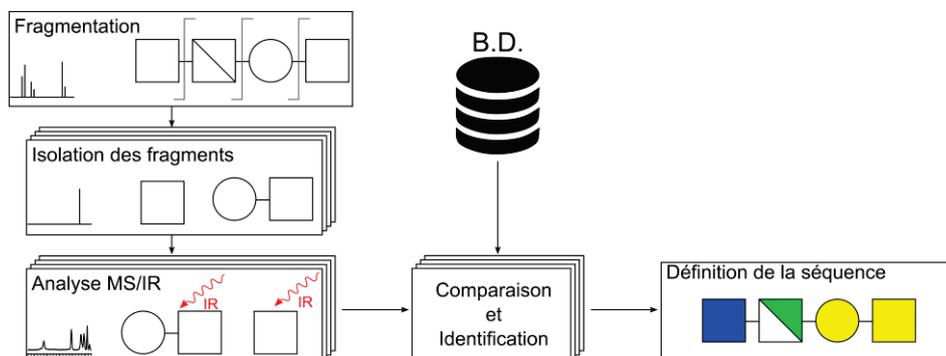


Figure 50 : Schéma de principe du séquençage d'oligosaccharides par MS/IR. Les différentes formes correspondent aux différentes classes de monosaccharides alors que la couleur indique la nature de ces monosaccharides.[26]

Cette méthode qui ne nécessite aucune préparation de l'échantillon par dérivatisation permet d'ouvrir de nombreuses possibilités dans le domaine de la glycomique, en particulier pour l'analyse d'oligosaccharides. L'analyse de polysaccharides, aux masses beaucoup plus élevées, n'a pas été abordée. En effet, il est nécessaire d'obtenir une couverture de séquence complète pour identifier le polysaccharide ce qui est difficile en spectrométrie de masse. Dans ce cas, il est préférable d'utiliser les méthodes habituelles permettant d'hydrolyser le polymère en chaînes de longueur compatible avec la spectrométrie de masse.

Cette méthode couplée de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie infrarouge est la première à permettre le séquençage d'un oligosaccharide sans nécessiter de dérivatisation ou l'apport d'informations obtenues par d'autres méthodes. Toutefois, pour séquencer un oligosaccharide avec cette méthode, il est nécessaire de travailler sur des échantillons ne contenant pas de mélange d'isomères. Pour dépasser cette limitation, il sera nécessaire de coupler cet instrument avec des méthodes séparatives telle que la mobilité ionique, la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire, comme discuté au chapitre IV.

5. Bibliographie

1. Berman, E. S. F.; Kulp, K. S.; Knize, M. G.; Wu, L.; Nelson, E. J.; Nelson, D. O.; Wu, K. J. Distinguishing Monosaccharide Stereo- and Structural Isomers with TOF-SIMS and Multivariate Statistical Analysis. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6497–6503.
2. Fouquet, T.; Charles, L. Distinction and quantitation of sugar isomers in ternary mixtures using the kinetic method. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 60–67.
3. Nagy, G.; Pohl, N. L. B. Monosaccharide Identification as a First Step toward *de Novo* Carbohydrate Sequencing: Mass Spectrometry Strategy for the Identification and Differentiation of Diastereomeric and Enantiomeric Pentose Isomers. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 4566–4571.
4. Nagy, G.; Pohl, N. L. B. Complete Hexose Isomer Identification with Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, *26*, 677–685.
5. Dwivedi, P.; Bendiak, B.; Clowers, B. H.; Hill, H. H. Rapid resolution of carbohydrate isomers by electrospray ionization ambient pressure ion mobility spectrometry-time-of-flight mass spectrometry (ESI-APIMS-TOFMS). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1163–1175.
6. Li, H.; Giles, K.; Bendiak, B.; Kaplan, K.; Siems, W. F.; Hill, H. H. Resolving Structural Isomers of Monosaccharide Methyl Glycosides Using Drift Tube and Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 3231–3239.
7. Gaye, M. M.; Nagy, G.; Clemmer, D. E.; Pohl, N. L. B. Multidimensional Analysis of 16 Glucose Isomers by Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Chem.* **2016**.
8. Contreras, C. S.; Polfer, N. C.; Oomens, J.; Steill, J. D.; Bendiak, B.; Eyler, J. R. On the path to glycan conformer identification: Gas-phase study of the anomers of methyl glycosides of N-acetyl-d-glucosamine and N-acetyl-d-galactosamine. *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, *330–332*, 285–294.
9. Cagmat, E. B.; Szczepanski, J.; Pearson, W. L.; Powell, D. H.; Eyler, J. R.; Polfer, N. C. Vibrational signatures of metal-chelated monosaccharide epimers: gas-phase infrared spectroscopy of Rb⁺-tagged glucuronic and iduronic acid. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 3474–3479.
10. Fasciotti, M.; Sanvido, G. B.; Santos, V. G.; Lalli, P. M.; McCullagh, M.; de Sá, G. F.; Daroda, R. J.; Peter, M. G.; Eberlin, M. N. Separation of isomeric disaccharides by traveling wave ion mobility mass spectrometry using CO₂ as drift gas: Increasing ion mobility Synapt resolution with CO₂. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 1643–1647.
11. Polfer, N. C.; Valle, J. J.; Moore, D. T.; Oomens, J.; Eyler, J. R.; Bendiak, B. Differentiation of Isomers by Wavelength-Tunable Infrared Multiple-Photon Dissociation-Mass Spectrometry: Application to Glucose-Containing Disaccharides. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 670–679.
12. Stefan, S. E.; Eyler, J. R. Differentiation of glucose-containing disaccharides by infrared multiple photon dissociation with a tunable CO₂ laser and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2010**, *297*, 96–101.
13. Williams, J. P.; Grabenauer, M.; Holland, R. J.; Carpenter, C. J.; Wormald, M. R.; Giles, K.; Harvey, D. J.; Bateman, R. H.; Scrivens, J. H.; Bowers, M. T. Characterization of simple isomeric oligosaccharides and the rapid separation of glycan mixtures by ion mobility mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2010**, *298*, 119–127.
14. Domon, B.; Costello, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj. J.* **1988**, *5*, 397–409.
15. Both, P.; Green, A. P.; Gray, C. J.; Šardžík, R.; Voglmeir, J.; Fontana, C.; Austeri, M.; Rejzek, M.; Richardson, D.; Field, R. A.; Widmalm, G.; Flitsch, S. L.; Eyers, C. E. Discrimination of epimeric glycans and glycopeptides using IM-MS and its potential for carbohydrate sequencing. *Nat. Chem.* **2013**, *6*, 65–74.
16. Hofmann, J.; Hahm, H. S.; Seeberger, P. H.; Pagel, K. Identification of carbohydrate anomers using ion mobility–mass spectrometry. *Nature* **2015**, *526*, 241–244.
17. Li, H.; Bendiak, B.; Siems, W. F.; Gang, D. R.; Hill, H. H. Ion mobility mass spectrometry analysis of isomeric disaccharide precursor, product and cluster ions: Analysis of isomeric disaccharide precursor, product and cluster ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 2699–2709.

18. Gaye, M. M.; Kurulugama, R.; Clemmer, D. E. Investigating carbohydrate isomers by IMS-CID-IMS-MS: precursor and fragment ion cross-sections. *The Analyst* **2015**, *140*, 6922–6932.
19. Brown, D. J.; Stefan, S. E.; Berden, G.; Steill, J. D.; Oomens, J.; Eyler, J. R.; Bendiak, B. Direct evidence for the ring opening of monosaccharide anions in the gas phase: photodissociation of aldohexoses and aldohexoses derived from disaccharides using variable-wavelength infrared irradiation in the carbonyl stretch region. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 2469–2481.
20. Varmuza, K.; Penchev, P. N.; Scsibrany, H. Maximum common substructures of organic compounds exhibiting similar infrared spectra. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1998**, *38*, 420–427.
21. Kim, S.; Rajapakse, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *62*, 357–368.
22. Hamer, S. N.; Cord-Landwehr, S.; Biarnés, X.; Planas, A.; Waegeman, H.; Moerschbacher, B. M.; Kolkenbrock, S. Enzymatic production of defined chitosan oligomers with a specific pattern of acetylation using a combination of chitin oligosaccharide deacetylases. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8716.
23. Chambon, R.; Despras, G.; Brossay, A.; Vauzeilles, B.; Urban, D.; Beau, J.-M.; Armand, S.; Cottaz, S.; Fort, S. Efficient chemoenzymatic synthesis of lipo-chitin oligosaccharides as plant growth promoters. *Green Chem* **2015**, *17*, 3923–3930.
24. Bülow, H. E.; Hobert, O. The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2006**, *22*, 375–407.
25. Qin, Y.; Ke, J.; Gu, X.; Fang, J.; Wang, W.; Cong, Q.; Li, J.; Tan, J.; Brunzelle, J. S.; Zhang, C.; Jiang, Y.; Melcher, K.; Li, J.; Xu, H. E.; Ding, K. Structural and Functional Study of d-Glucuronyl C5-epimerase. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 4620–4630.
26. Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Freeze, H. H.; Stanley, P.; Marth, J. D.; Bertozzi, C. R.; Hart, G. W.; Etzler, M. E. Symbol nomenclature for glycan representation. *PROTEOMICS* **2009**, *9*, 5398–5399.

Chapitre III

Isomères de position, application aux glycosaminoglycanes

Faits marquants

Différenciation des isomères de position (page 95)

Spectroscopie IRMPD d'anions dans la région des 3 μm
(page 105)

Élucidation du motif de sulfatation dans les glycosaminoglycanes
(page 118)

Les molécules biologiques subissent des modifications après leur biosynthèse afin de moduler leur activité et par exemple, dans le cas des protéines, ces modifications sont dites post-traductionnelles. Elles sont variées et de plusieurs types (acétylation, glycosylation, phosphorylation, sulfatation) et les plus courantes sont la phosphorylation et la N- et la O-glycosylation.[1] Pour la classe de biopolymères que sont les carbohydrates ces modifications sont regroupées sous le terme de modifications post-glycosylationnelles. Ce terme rassemble entre autres acétylation, méthylation, phosphorylation ou sulfatation qui interviennent essentiellement au niveau des hydroxyles ou des amines présents sur l'oligosaccharide.[2–4]

Ces modifications post-glycosylationnelles sont courantes et les O-acétylations sont notamment impliquées dans les processus cancéreux[5–7] mais sont également retrouvées sur les O-antigènes de bactéries.[8] Enfin pour ce qui est des sulfatations, ce sont des modifications qui sont retrouvées dans la famille des glycosaminoglycanes. L'activité de ces molécules est notamment modulée par leur motif de sulfatation[9] qui dépend de la position des groupements sulfates sur les hydroxyles et sur les amines libres du polymère.

Ces changements structuraux sont difficiles à déterminer puisqu'ils ont tendance à migrer naturellement[10] ou encore lors de l'analyse.[11] De plus ces modifications augmentent la difficulté d'analyse puisque ces décorations peuvent intervenir à différentes positions sur les oligosaccharides et l'identification de ces positions se fait soit par spectroscopie RMN, en nécessitant de grandes quantités d'échantillon pur, soit par des techniques basées sur la spectrométrie de masse, mais nécessite des informations structurelles supplémentaires pour identifier la position de ces modifications.[12]

Dans ce chapitre, nous explorerons le potentiel de la méthode MS/IR pour l'élucidation du motif de sulfatation de différents glycosaminoglycanes. Tout d'abord, la pertinence de la métrique infrarouge sera vérifiée sur un cas simple d'isomères de position : la glucosamine 6-sulfate et 3-sulfate. Deux régions infrarouges seront explorées, entre 2700 et 3700 cm^{-1} ainsi qu'entre 700 et 1800 cm^{-1} et ceci pour deux états de charge différents : protoné et déprotoné. Ensuite cette méthode MS/IR sera appliquée à des cas plus complexes comme des disaccharides de glycosaminoglycanes où le recours au séquençage est parfois nécessaire afin d'identifier la position des sulfates sur la molécule. Finalement, afin de démontrer le potentiel de la technique pour l'analyse de plus gros systèmes, le séquençage d'un tétrasaccharide disulfaté sera réalisé afin d'identifier la position des sulfates sur la molécule.

1. Glucosamine 3-sulfate vs. glucosamine 6-sulfate protonées

1.1. Région OPO

1.1.1. Glucosamine 6-sulfate

Le spectre IR de la glucosamine 6-sulfate est représenté entre 2700 et 3700 cm^{-1} en figure 51. Il est composé de trois régions distinctes, la région des modes CH entre 2800 et 3000 cm^{-1} avec deux bandes à 2943 et 2975 cm^{-1} , la région des modes NH entre 3100 et 3400 cm^{-1} composée de deux bandes principales à 3255 et 3333 cm^{-1} et la région des modes OH au-dessus de 3400 cm^{-1} composée de quatre bandes principales à 3541, 3582, 3605 et 3633 cm^{-1} .

Une recherche conformationnelle a été réalisée afin d'explorer les différentes structures possibles de la glucosamine 6-sulfate et de calculer les spectres IR correspondants. Les résultats obtenus ont été analysés en termes d'énergie, de conformation et de correspondance de leur spectre IR calculé avec l'expérience. La figure 51 représente une sélection des conformations obtenues en dessous de 25 kJ/mol pour l'anomère α ainsi que les spectres IR des anomères α et β pour chacune de ces conformations.

Les différentes conformations observées à basse énergie sont des chaises possédant une variété de possibilités dans l'orientation des hydroxyles et dans les interactions qu'ils forment avec le reste de la molécule. À plus haute énergie, des formes moins stables énergétiquement sont observées comme les conformations de type bateau. Les cinq conformères sélectionnés représentent différentes possibilités observées en dessous de 25 kJ/mol, à savoir : des chaises 4C_1 avec l'hydroxyle 4 en interaction avec un des oxygènes de la fonction sulfate, qui sont les formes les plus stables et majoritaires, des chaises 4C_1 avec l'hydroxyle 1 en interaction avec un des oxygènes de la fonction sulfate, ou encore des chaises 4C_1 sans aucune interaction. L'autre chaise possible, à savoir 1C_4 , est également observée mais avec une seule possibilité d'interaction, entre l'hydroxyle en position 3 et l'un des oxygènes de la fonction sulfate. Enfin, à plus haute énergie, la conformation bateau est observée avec une interaction entre l'hydroxyle en position 4 et l'un des oxygènes de la fonction sulfate.

Les spectres IR théoriques de chacune des conformations observées sont distincts et permettent ainsi d'attribuer le spectre IR expérimental à l'une des familles de conformations sélectionnées. Les spectres IR théoriques sont caractérisés par des modes d'élongation C-H (gris) en dessous de 3000 cm^{-1} , de trois modes d'élongation N-H (bleu) entre 3100 et 3400 cm^{-1} et des modes d'élongation O-H (rouge pour les hydroxyles du cycle pyranose et jaune pour celui du sulfate) au-dessus de 3400 cm^{-1} . Les modes C-H ne semblent pas avoir une signature définie en fonction de la conformation, en revanche, la position des modes O-H et N-H diffère selon la conformation du cycle et l'orientation des hydroxyles.

Les modes d'élongation N-H permettent d'identifier la conformation du cycle, grâce à leur motif, celui-ci est compris entre 3200 et 3400 cm^{-1} lorsque la conformation est de type chaise 4C_1 , alors que le mode du troisième N-H est décalé en-dessous de 3100 cm^{-1} , dans le cas d'une conformation chaise de type 1C_4 ou bateau. Le spectre IR expérimental est composé de deux bandes à 3255 et 3330 cm^{-1} , et d'une asymétrie dans la première bande qui indique la présence d'un mode de plus faible intensité. De plus, aucune bande n'est observée entre les deux bandes C-H et 3200 cm^{-1} , ce motif est donc en accord avec celui d'une conformation 4C_1 . Une information supplémentaire peut être obtenue grâce à la proximité de la fonction amine avec l'hydroxyle en position 1 : celle de la configuration anomérique de la glucosamine 6-sulfate. Pour le cas des chaises 4C_1 , les anomères α sont caractérisés par un motif étalé de leurs bandes N-H compris entre 3200 et 3400 cm^{-1} puisque l'hydroxyle en position 1 est en position axiale et donc à proximité de l'amine. En revanche, le motif NH est compact et autour de 3300 cm^{-1} dans le cas de l'anomère β puisque l'hydroxyle en position 1 est en position équatoriale, donc éloigné de l'amine, ne perturbant pas les modes d'élongation des N-H. Dans le spectre IR expérimental, les deux bandes majoritaires sont écartées et positionnées à 3255 et 3330 cm^{-1} suggérant une présence majoritaire de l'anomère α de la glucosamine 6-sulfate. La proportion en anomères α et β a été mesurée dans des conditions similaires de solvant par RMN et la forme majoritaire est bien confirmée comme étant l'anomère α de la glucosamine 6-sulfate. Par comparaison avec les spectres IR théoriques, le spectre IRMPD est identifié comme étant celui d'un mélange des anomères α et β de la glucosamine 6-sulfate en conformation chaise 4C_1 .

Les modes d'élongation des OH quant à eux permettent d'obtenir une information supplémentaire concernant l'orientation du sulfate vis-à-vis du cycle. Le mode OH de la fonction sulfate n'est pas modifié par la conformation adoptée par le cycle ni par les interactions et se trouve autour de 3580 cm^{-1} . La position des autres modes OH dépend des interactions entre les hydroxyles du cycle et la fonction sulfate. Au-dessus de 3600 cm^{-1} , ils sont considérés comme libres et liés en dessous de 3600 cm^{-1} . Plus l'interaction entre l'hydroxyle du cycle et l'oxygène de la fonction sulfate sera forte, plus la bande OH sera décalée vers les plus basses énergies. La bande expérimentale à 3550 cm^{-1} et l'absence de bandes au-dessus de 3650 cm^{-1} sont en accord avec une conformation chaise 4C_1 avec une interaction entre l'hydroxyle en position 4 et un des oxygènes de la fonction sulfate, ce qui correspond à la conformation calculée de plus basse énergie.

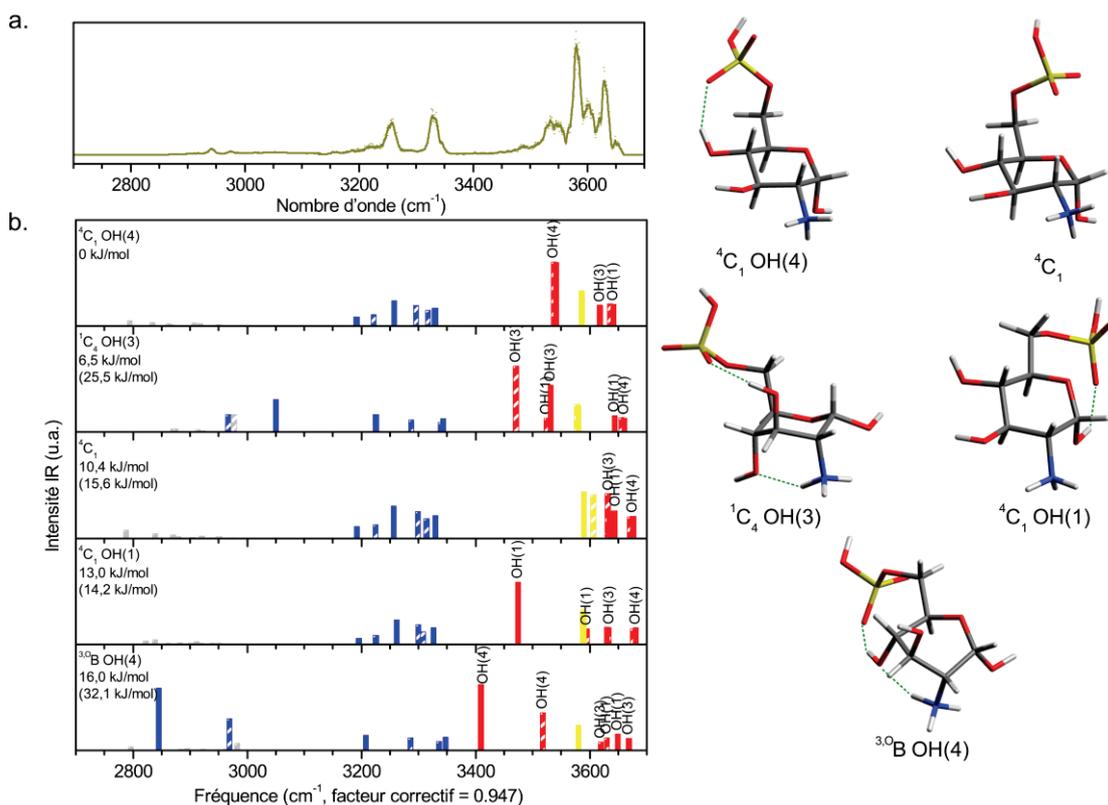


Figure 51 : Spectre IRMPD de la glucosamine 6-sulfate (a) et les spectres IR théoriques (b) de différentes conformations du cycle obtenus par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd). Un facteur correctif de 0,947 est appliqué et un code couleur est attribué pour identifier les différents modes d'élongation : en gris sont représentés les modes CH, en bleu les modes NH, en jaune le mode OH de la fonction sulfate et en rouge les modes OH du cycle osidique. Les modes de vibration des anomères β de conformation similaire à celles présentées pour l'anomère α sont hachurés.

1.1.2. Glucosamine 3-sulfate

Le spectre IR de la glucosamine 3-sulfate, la recherche conformationnelle et le calcul des spectres IR ont été réalisés dans les mêmes conditions et avec les mêmes paramètres que pour la glucosamine 6-sulfate.

La figure 52 représente le spectre IR expérimental entre 2700 et 3700 cm^{-1} ainsi qu'une sélection des conformations observées en dessous de 25 kJ/mol pour l'anomère α et les spectres IR calculés correspondant pour les anomères α et β . Le spectre IR expérimental est composé de trois régions distinctes : la région des modes CH entre 2800 et 3000 cm^{-1} avec deux bandes à 2895 et 2945 cm^{-1} , la région des modes NH entre 3100 et 3400 cm^{-1} composée de trois bandes principales à 3190, 3243 et 3330 cm^{-1} et la région des modes OH au-dessus de 3400 cm^{-1} composée de deux bandes convoluées à 3530 et 3560 cm^{-1} et deux bandes parfaitement résolues à 3627 et 3666 cm^{-1} .

Comme pour la glucosamine 6-sulfate protonée, les conformations observées sont majoritairement des chaises de type 4C_1 avec des variations dans l'orientation des hydroxyles et leurs interactions avec

le reste de la molécule. Toutefois, d'autres formes de cycles sont observées à plus haute énergie comme des chaises de type 1C_4 ou des formes skew de type 1S_3 . Les quatre conformations représentées sur la figure 52 décrivent les différentes formes observées en dessous de 25 kJ/mol. Les formes majoritaires sont des chaises de type 4C_1 , avec une interaction entre l'hydroxyle en position 4 et l'oxygène en position 6 ou sans d'interaction entre les hydroxyles. À plus haute énergie, des formes skew de type 1S_3 sont retrouvées avec une interaction entre l'amine et la fonction sulfate. Enfin, des formes chaises de type 1C_4 sont retrouvées avec des interactions possibles entre l'hydroxyle de la fonction sulfate et l'oxygène en position 6. Contrairement au cas de la glucosamine 6-sulfate protonée, aucune forme bateau n'est observée, la position du sulfate à proximité de l'amine ne favorisant pas cette conformation.

Le motif des modes d'élongation permet comme pour la glucosamine 6-sulfate protonée d'identifier la conformation observée expérimentalement. Le motif NH du spectre expérimental compris entre 3100 et 3400 cm^{-1} comprend trois bandes distinctes ce qui n'est le cas pour aucune conformation. En effet, l'amine étant proche de la fonction sulfate, l'un des modes N-H est toujours décalé en dessous de 3100 cm^{-1} . Ces trois bandes mettent en évidence la présence d'un mélange entre les anomères α et β de la glucosamine 3-sulfate. Les spectres IR théoriques sont différents selon les conformations : la forme skew est caractérisée par un motif resserré alors que les formes chaises possèdent un motif plus étalé. Enfin, le mode N-H lié est très différent entre les chaises 4C_1 et les chaises 1C_4 , ces dernières possédant un mode N-H autour de 3050 cm^{-1} ce qui n'est pas observé expérimentalement. Le mode N-H lié des chaises 4C_1 est observé dans la même gamme que les modes C-H de la molécule ce qui ne permet pas de le distinguer. Le spectre IR expérimental est donc en faveur d'une conformation chaise de type 4C_1 .

Enfin, les modes d'élongation des hydroxyles permettent d'obtenir une information sur le type d'interaction entre les hydroxyles de la molécule. La bande expérimentale observée autour de 3545 cm^{-1} et large d'environ 60 cm^{-1} correspond à deux bandes partiellement résolues. Cela indique que la conformation observée en phase gazeuse possède une interaction intramoléculaire ce qui correspond au spectre IR théorique d'une chaise 4C_1 avec une interaction entre l'hydroxyle en position 4 et l'oxygène en position 6.

Par comparaison avec les spectres IR théoriques des différentes conformations sélectionnées, le spectre IR expérimental est identifié comme étant celui d'un mélange des anomères α et β de la glucosamine 3-sulfate. La conformation adoptée par la glucosamine 3-sulfate est une chaise de type 4C_1 avec une interaction hydrogène entre l'hydroxyle en position 4 et l'oxygène de l'hydroxyle en

position 6 ainsi qu'entre l'amine et l'un des oxygènes de la fonction sulfate et correspond à la conformation calculée de plus basse énergie.

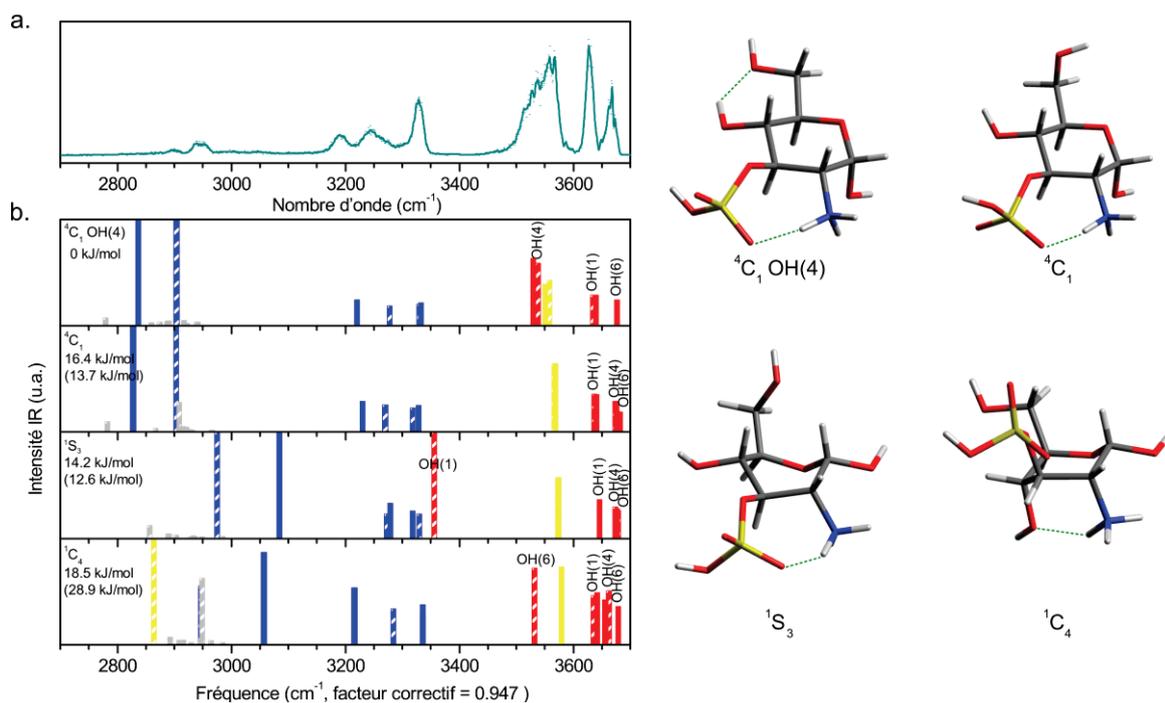


Figure 52 : Spectre IRMPD de la glucosamine 3-sulfate (a) et les spectres IR théoriques (b) de différentes conformations du cycle obtenus par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd). Un facteur correctif de 0,947 est appliqué et un code couleur est attribué pour identifier les différents modes d'élongation : en gris sont représentés les modes CH, en bleu les modes NH, en jaune le mode OH de la fonction sulfate et en rouge les modes OH du cycle osidique. Les modes de vibration des anomères β de conformation similaire à celles présentées pour l'anomère α sont hachurés.

1.1.3. Comparaison de la glucosamine 6-sulfate et 3-sulfate protonée entre 2700 et 3700 cm^{-1}

Les spectres IRMPD de la glucosamine 6-sulfate et de la glucosamine 3-sulfate sont représentés entre 2700 et 3700 cm^{-1} et comparés sur la figure 53. Ces deux spectres sont distincts et deux bandes caractéristiques sont observées. À 3666 cm^{-1} , une bande est observée uniquement sur le spectre de la glucosamine 3-sulfate, et est attribuée au mode d'élongation de l'hydroxyle en position 6. De même la bande observée 3605 cm^{-1} dans le spectre IRMPD de la glucosamine 6-sulfate est absente de celui de la glucosamine 3-sulfate. Cette bande est attribuée au mode d'élongation de l'hydroxyle en position 3 ce qui explique son absence dans le cas de la glucosamine 3-sulfate.

Alors que les glucosamine 3-sulfate et 6-sulfate possèdent la même conformation de cycle, les spectres vibrationnels sont toutefois différents et cette signature ne dépend donc que de la position du sulfate. La région des 3 μm est donc pertinente pour différencier des isomères de position même si la signature IR obtenue ne provient pas des modes du sulfate mais des hydroxyles présents autour du cycle.

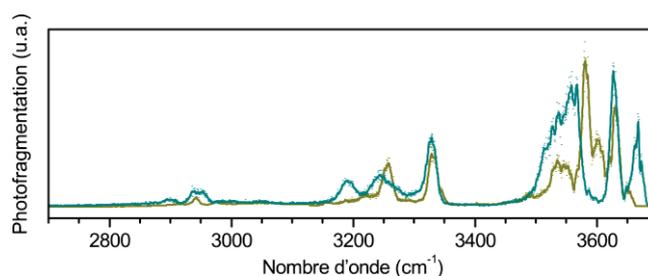


Figure 53 : Spectres IRMPD de la glucosamine 6-sulfate (jaune foncé) et 3-sulfate (turquoise) entre 2700 et 3700 cm^{-1}

1.2. Région LEL

Pour obtenir le spectre IRMPD dans la gamme spectrale 700-1800 cm^{-1} , il est nécessaire d'utiliser un laser à électrons libres à la place du laser OPO accordable. Cette région permet d'observer dans le cas d'une molécule sulfatée protonée quatre modes SO caractéristiques de la fonction sulfate : les modes SO_2 asymétrique et symétrique, le mode $\text{SO}(\text{H})$ et le mode $\text{SO}(\text{C})$.

Dans cette région, les modes du sulfate ne sont pas suffisamment bien traités en utilisant l'approche précédente par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd). Afin de corriger cela, Loïc Barnes et le Professeur Allouche ont réalisé des calculs anharmoniques de type GVPT2.

1.2.1. Glucosamine 6-sulfate

La figure 54 représente le spectre IR expérimental entre 700 et 1800 cm^{-1} ainsi que les spectres IR anharmoniques calculés des deux anomères α et β de conformation sélectionnée d'après l'attribution effectuée dans la région des 3 μm de la glucosamine 6-sulfate protonée. Le spectre IR expérimental est composé de deux régions, dans la première région, au-dessus de 1300 cm^{-1} , deux bandes sont observées, l'une à 1470 et l'autre à 1600 cm^{-1} . Dans la seconde région, en-dessous de 1300 cm^{-1} , le motif est plus complexe et dominé par trois bandes intenses, observées à 880, 995 et 1177 cm^{-1} . Les spectres IR anharmoniques calculés des anomères α et β correspondent bien au spectre expérimental, confirmant l'attribution de la structure effectuée grâce à la région des 3 μm et permettant d'identifier l'empreinte spectroscopique typique d'un groupement sulfate neutre composé de quatre modes entre 700 et 1800 cm^{-1} : $\text{SO}(\text{C})$, $\text{SO}(\text{H})$, SO_2 symétrique et SO_2 asymétrique respectivement observés à 780, 880, 1177 et 1470 cm^{-1} .

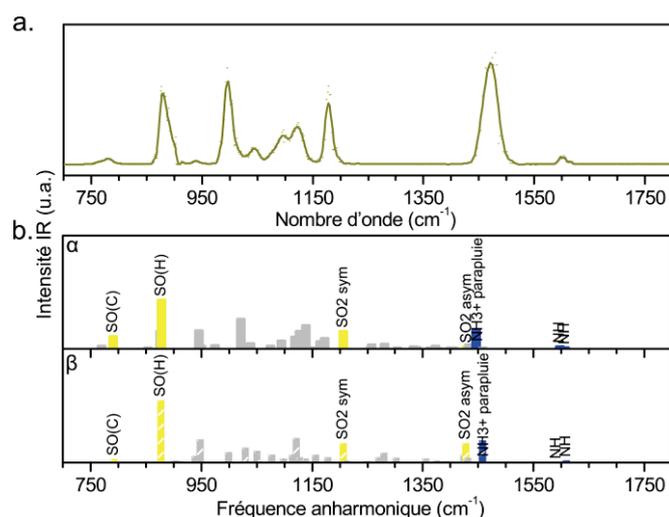


Figure 54 : Spectre IRMPD de la glucosamine 6-sulfate protonée (a) et spectres anharmoniques des anomères α et β (b) de conformation de type chaise 4C_1 avec interaction entre l'hydroxyle en position 4 et la fonction sulfate. Les modes du sulfate sont identifiés en jaune, les modes de l'amine en bleu et les autres modes sont représentés en gris.

1.2.2. Glucosamine 3-sulfate

La figure 55 représente le spectre IR expérimental entre 700 et 1800 cm^{-1} ainsi que les spectres IR anharmoniques calculés des deux anomères α et β de conformation sélectionnée d'après l'attribution effectuée dans la région des 3 μm de la glucosamine 3-sulfate protonée. Le spectre IR expérimental est composé de deux régions, dans la première région, au-dessus de 1300 cm^{-1} , trois bandes sont observées à 1425, 1475 et 1613 cm^{-1} . Dans la seconde région, en-dessous de 1300 cm^{-1} , le motif est composé de quatre bandes intenses à 908, 1010, 1142 et 1192 cm^{-1} . Les spectres IR anharmoniques calculés des anomères α et β correspondent bien au spectre expérimental, confirmant l'attribution de la structure effectuée grâce à la région des 3 μm et permettant d'identifier l'empreinte spectroscopique d'un groupement sulfate neutre composé de quatre modes entre 700 et 1800 cm^{-1} : SO(C), SO(H), SO₂ symétrique et SO₂ asymétrique respectivement observés à 818, 908, 1192 et 1425 cm^{-1} .

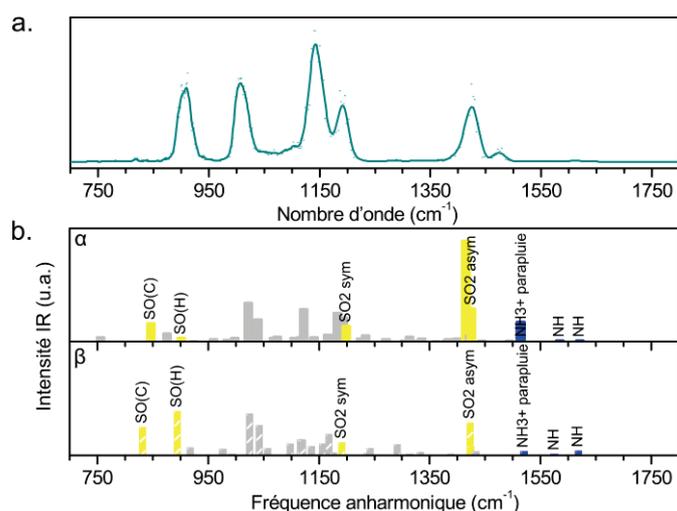


Figure 55 : Spectre IRMPD de la glucosamine 3-sulfate protonée (a) et spectres anharmoniques des anomères α et β (b) de conformation de type chaise 4C_1 avec interaction entre l'hydroxyle en position 4 et l'oxygène en position 6. Les modes du sulfate sont identifiés en jaune, les modes de l'amine en bleu et les autres modes sont représentés en gris.

1.2.3. Comparaison de la glucosamine 6-sulfate et 3-sulfate protonée dans la région 700-1800 cm^{-1}

Pour la glucosamine 6-sulfate et la glucosamine 3-sulfate protonée, les spectres IR anharmoniques calculés des deux anomères α et β sont très similaires. Par exemple, dans le cas de la glucosamine 6-sulfate protonée, les modes du groupement sulfate sont observés à 791, 879, 1206 et 1430 cm^{-1} pour l'anomère α et 792, 877, 1207, 1428 cm^{-1} pour l'anomère β . Les modes de pliement du groupement NH_3^+ pourtant proche de la position anomérique ne sont pas suffisamment affectés pour l'identifier. Enfin, entre 900 et 1200 cm^{-1} , de nombreux modes mous sont observés, une différence de motif peut être observée entre les anomères α et β mais ne permet pas d'attribuer un motif expérimental spécifique à l'un des anomères. Le groupement sulfate étant éloigné de la position anomérique, il n'y a pas d'influence de la nature de l'anomère sur le positionnement des modes du sulfate. De plus, dans cette gamme spectrale, les différences observées théoriquement ne sont pas suffisantes pour différencier l'anomère α de l'anomère β .

Les spectres IRMPD de la glucosamine 6-sulfate et glucosamine 3-sulfate représentés sur la figure 56 ont un motif global différent entre 700 et 1800 cm^{-1} alors que ces deux molécules possèdent la même conformation de cycle et ne diffèrent que par la position de leur groupement sulfate. Toutefois, ils sont essentiellement dominés par les bandes des modes du groupement sulfate pour lesquelles de petites variations dans la position sont observées selon la localisation de la fonction allant de -45 à +38 entre les modes de la glucosamine 3-sulfate et de la glucosamine 6-sulfate protonée.

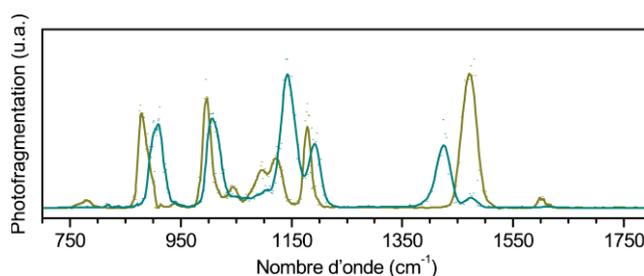


Figure 56 : Spectres IRMPD de la glucosamine 6-sulfate (jaune foncé) et 3-sulfate (turquoise) entre 700 et 1800 cm^{-1}

1.3. Conclusion

Pour conclure, il est possible d'identifier la conformation, la configuration anomérique, ou la présence d'un mélange d'anomères ainsi que le type d'interaction intramoléculaires entre les différentes fonctions présentent autour du cycle (sulfate, amine, hydroxyles) par comparaison du spectre IRMPD et des spectres IR calculés par DFT.

La glucosamine 6-sulfate et la glucosamine 3-sulfate protonée possèdent la même structure de cycle : une conformation de type chaise 4C_1 . Toutefois, leur spectre IRMPD est différent, et il est possible grâce au couplage de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie infrarouge de différencier ces deux isomères de position dans la région des 3 μm , c'est-à-dire de façon indirecte, en observant les modes d'élongation des O-H/N-H/C-H.

Pour observer de façon directe l'influence de la position du sulfate sur le spectre infrarouge, il est nécessaire de s'intéresser à une autre région entre 700 et 1800 cm^{-1} . Celle-ci peut être obtenue grâce à un laser à électrons libres et permet d'observer les modes d'élongation des sulfates, les modes de plissement de la fonction amine protonée et de nombreux modes mous (C-O/C-C). Il est possible dans cette gamme infrarouge de différencier la glucosamine 3-sulfate et 6-sulfate protonée qui ne diffèrent que par la position de leur sulfate. Néanmoins, par rapport à la région des 3 μm , il n'a pas été possible de confirmer la présence des deux anomères par comparaison du spectre IRMPD aux spectres IR théoriques.

2. Étude de monosaccharides sulfatés déprotonés

Les molécules sulfatées sont naturellement observées comme déprotonées dans les milieux biologiques, il peut être intéressant d'étudier leur structure dans cet état de charge. De plus, ces molécules sont plus facilement ionisées en spectrométrie de masse en mode négatif. Toutefois, l'étude de la structure de molécules déprotonées par spectroscopie IRMPD est moins courante que pour des molécules chargées positivement puisque la photofragmentation est plus difficile avec ce mode d'ionisation. En effet, seulement quelques études sont reportées dans la gamme 800-1800 cm^{-1} disponible sur des lasers à électrons libres,[13–17] démontrant le potentiel de cette région spectrale

afin d'obtenir des informations sur la localisation de la charge négative. L'utilisation de la région 2700-3700 cm^{-1} qui est habituellement très informative est quant à elle très peu étudiée[18,19] voire impossible.[20]

Les développements instrumentaux à Lyon ont permis de rendre accessible la gamme 2700-3700 cm^{-1} pour l'étude systématique de molécules déprotonées sans recours à un laser CO_2 supplémentaire. Les deux régions, 700-1700 cm^{-1} et 2700-3700 cm^{-1} sont donc explorées dans le cas des monosaccharides sulfatés et déprotonés sur la glucosamine 6-sulfate, la glucosamine 3-sulfate et le fucose 3-sulfate.

2.1. Région LEL

Les spectres de la glucosamine 6-sulfate et du fucose 3-sulfate déprotonés sont représentés entre 700 et 1700 cm^{-1} en figure 57. Ces deux spectres sont remarquablement similaires malgré une structure moléculaire différente et sont dominés par quatre bandes observées autour de 1000, 1060, 1200 et 1280 cm^{-1} . La région hautement informative des lasers à électrons libres semble dans le cas des molécules sulfatées peu efficace pour obtenir des informations sur la structure, en effet, ce même motif est par exemple observé dans le cas de la sulfosérine déprotonée.[20]

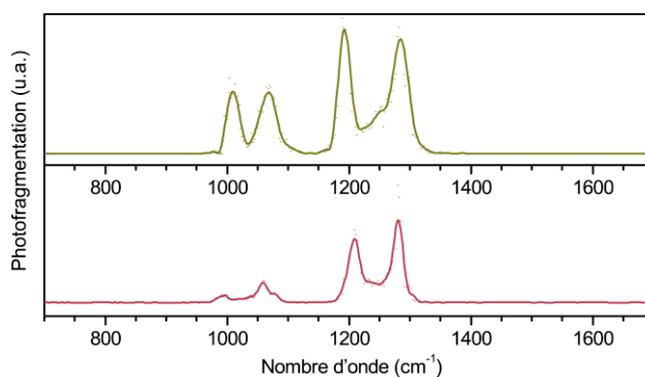


Figure 57 : Spectre IRMPD de molécules déprotonées entre 700 et 1700 cm^{-1} . Glucosamine 6-sulfate (jaune foncé) et fucose 3-sulfate (rouge)

Des calculs théoriques ont été réalisés sur différents monosaccharides sulfatés et déprotonés afin d'identifier un intervalle spectral intéressant pour l'étude de ces molécules et les spectres IR théoriques obtenus sont reportés en figure 58. Ils confirment que peu de différences sont observables entre 700 et 1700 cm^{-1} , mais qu'en revanche, des différences notables sont attendues dans la gamme 2700-3700 cm^{-1} . Par exemple, le mode OH lié est observé à 3195 cm^{-1} dans le cas de la glucosamine 6-sulfate, 3261 cm^{-1} dans le cas de la glucosamine 3-sulfate et 3233 cm^{-1} dans le cas du fucose 3-sulfate.

Ces résultats théoriques confirment les résultats expérimentaux obtenus dans la région 700-1700 cm^{-1} , et semblent très prometteurs pour l'étude de molécules sulfatées et déprotonées dans la région 2700-3700 cm^{-1} .

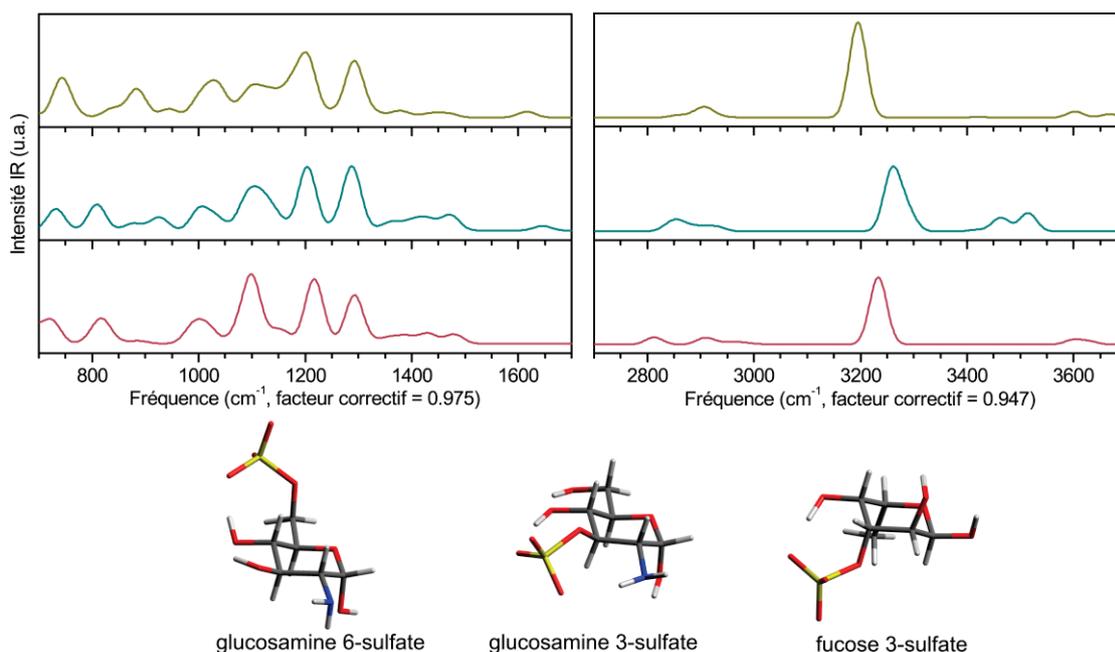


Figure 58 : Spectre infrarouge calculé (DFT CAMB3LYP/6-311++G(2df,2pd)) pour des conformères similaires pour la glucosamine 6-sulfate (jaune foncé), glucosamine 3-sulfate (turquoise), fucose 3-sulfate (rouge) dans les gammes LEL (gauche) et OPO (droite). Les modes de vibrations sont convolués par une gaussienne de 10 cm^{-1} de largeur à mi-hauteur.

2.2. Région OPO

2.2.1. Identification de différents monosaccharides sulfatés

La figure 59 représente les spectres IRMPD entre 2700 et 3700 cm^{-1} des trois molécules sulfatées et déprotonées précédentes, à savoir, glucosamine 6-sulfate, glucosamine 3-sulfate et fucose 3-sulfate. Comme prévu par la théorie, les spectres expérimentaux de ces oses sulfatés sont différents et permettent d'identifier la nature de l'ose mais aussi la position de la modification fonctionnelle.

Le spectre IRMPD de ces molécules déprotonées est composé d'une région en dessous de 3000 cm^{-1} qui correspond aux modes d'élongation des CH, et de motifs complexes entre 3000 et 3600 cm^{-1} , correspondant aux modes d'élongation des OH et des NH de la molécule.

La région des CH est très similaire pour ces trois molécules avec deux bandes observées à 2882 et 2920 cm^{-1} pour la glucosamine 6-sulfate, 2872 et 2906 cm^{-1} pour la glucosamine 3-sulfate et 2876 et 2917 cm^{-1} pour le fucose 3-sulfate. Dans cette région, le fucose 3-sulfate se distingue des glucosamines sulfatées par la présence d'une bande supplémentaire dans cette région à 2969 cm^{-1} due au CH_3 présent dans la famille des désoxy-hexoses.

La région au-dessus de 3000 cm^{-1} est différente pour les trois molécules sulfatées. Dans le cas de la glucosamine 6-sulfate, elle est composée d'une bande étendue centrée à 3190 cm^{-1} , d'un motif complexe avec trois massifs à 3320, 3408 et 3505 cm^{-1} ainsi que d'une bande résolue à 3576 cm^{-1} . Pour la glucosamine 3-sulfate, cette région est composée d'un motif complexe entre 3100 et 3580 cm^{-1} qui

se distingue par trois massifs à 3305, 3400 et 3500 cm^{-1} . Enfin, dans le cas du fucose 3-sulfate, qui ne comporte pas d'amine, le spectre IRMPD dans cette région semble plus défini avec une bande liée centrée à 3290 cm^{-1} , et trois bandes partiellement définies observées à 3530, 3557 et 3571 cm^{-1} .

Pour conclure, les spectres IRMPD expérimentaux confirment l'étude exploratoire théorique, à savoir que pour des molécules déprotonées, la région 2700-3700 cm^{-1} permet d'identifier la nature de l'ose mais aussi la position de son groupement sulfate. Cependant, les spectres vibrationnels réalisés dans cette région et dans cet état de charge sont très atypiques.

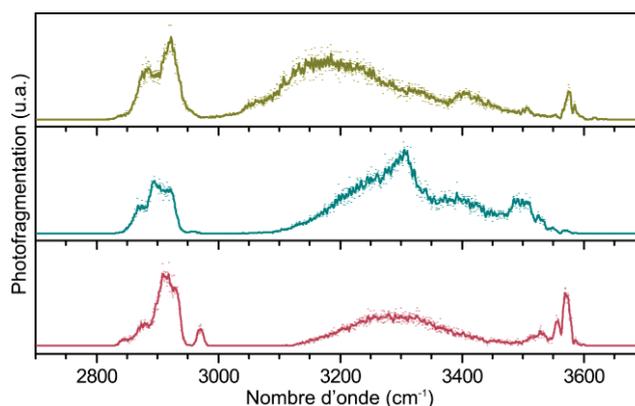


Figure 59 : Spectre IRMPD entre 2700 et 3700 cm^{-1} de la glucosamine 6-sulfate (jaune foncé), glucosamine 3-sulfate (turquoise) et du fucose 3-sulfate (rouge) déprotonés

2.2.2. Glucosamine 6-sulfate

La figure 60 représente le spectre IRMPD de la glucosamine 6-sulfate déprotonée obtenu entre 2700 et 3700 cm^{-1} ainsi que le spectre IR calculé de cinq conformations observées en-dessous de 25 kJ/mol. La recherche conformationnelle a été réalisée dans les mêmes conditions que pour le calcul des molécules protonées et les spectres IR théoriques obtenus sont différents selon la conformation adoptée par la glucosamine 6-sulfate.

Encore une fois, les conformations observées à basse énergie sont des chaises de type 4C_1 avec une interaction entre l'hydroxyle en position 4 et l'un des oxygènes de la fonction sulfate. Au-dessus de 15 kJ/mol, une variété de conformations est observée, à savoir, des skew de type 1S_3 ainsi que des chaises de type 1C_4 . Enfin pour l'anomère α , il est possible d'observer en plus, à haute énergie, des skew de type 0S_2 et des chaises de type 4C_1 avec une interaction entre l'hydroxyle en position 1 et l'un des oxygènes de la fonction sulfate.

Les spectres IR théoriques de ces conformations sont différents et composés de modes d'élongation des CH en dessous de 3000 cm^{-1} , et de modes d'élongation des OH ou des NH au-dessus de 3000 cm^{-1} . Comme pour les molécules protonées, les modes d'élongation des CH sont difficiles à interpréter en terme de conformation de la molécule alors que les modes d'élongation des OH permettent

d'identifier la conformation. Contrairement au cas des molécules protonées, les modes d'élongation des NH sont très peu intenses et ne semblent pas permettre de distinguer les anomères α et β de la glucosamine 6-sulfate.

Les modes d'élongation des OH quant à eux restent très intéressants pour identifier la conformation adoptée par la molécule car ils possèdent des motifs très variés selon les interactions intramoléculaires. Toutefois, peu importe la conformation, il y a toujours des bandes d'élongation OH au-dessus de 3580 cm^{-1} contrairement à ce qui est observé expérimentalement.

Par comparaison avec les spectres IR théoriques, il semble difficile d'attribuer une structure au spectre IRMPD expérimental à cause des bandes expérimentales qui sont très étendues et de l'absence de modes d'élongation O-H au-dessus de 3600 cm^{-1} contrairement à ce qui est observé théoriquement.

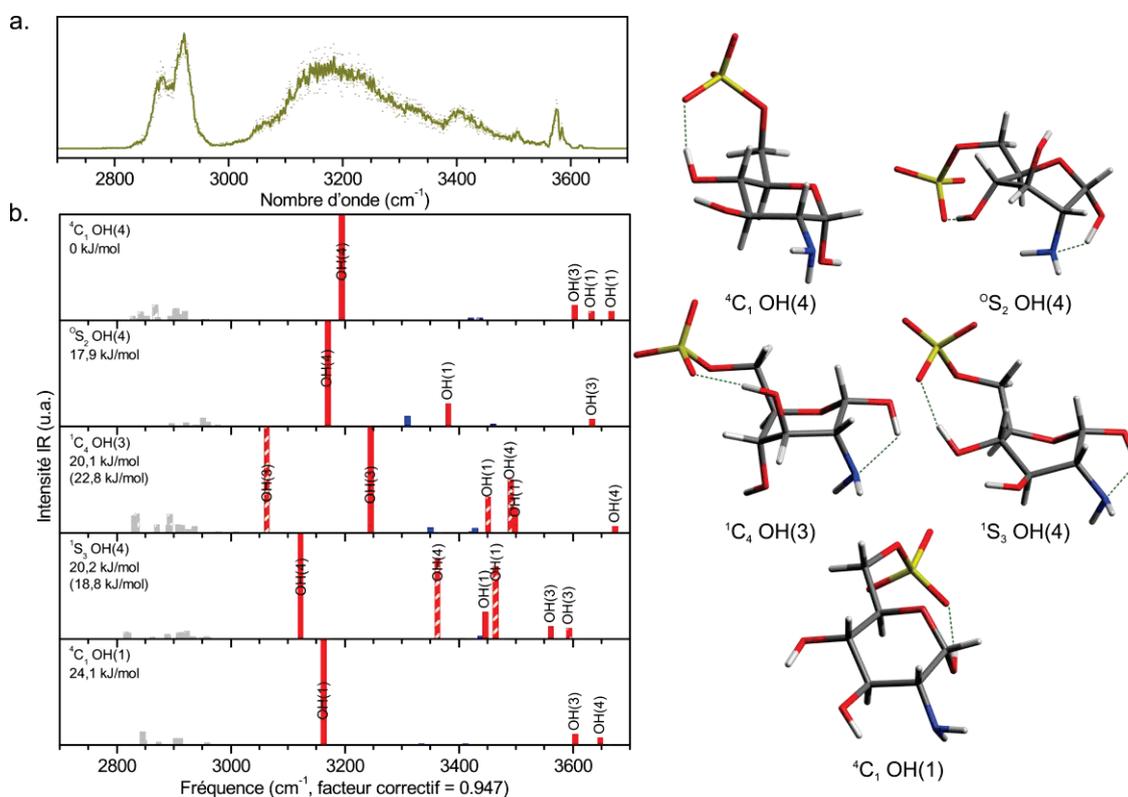


Figure 60 : Spectre IRMPD de la glucosamine 6-sulfate déprotonée (a) et les spectres IR théoriques (b) de différentes conformations du cycle obtenus par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd). Un facteur correctif de 0,947 est appliqué et un code couleur est attribué pour identifier les différents modes d'élongation : en gris sont représentés les modes CH, en bleu les modes NH, et en rouge les modes OH du cycle osidique. Les modes de vibration des anomères β de conformation similaire à celles présentées pour l'anomère α sont hachurés.

2.2.3. Glucosamine 3-sulfate

La figure 61 représente le spectre IRMPD de la glucosamine 3-sulfate déprotonée obtenu entre 2700 et 3700 cm^{-1} ainsi que le spectre IR calculé de cinq conformations observées en-dessous de 35 kJ/mol . Les conformations observées à basse énergie sont des chaises de type 4C_1 avec une interaction entre

l'hydroxyle en position 6 et l'oxygène en position 4 ainsi que des chaises de type 4C_1 avec l'hydroxyle en position 6 libre. Aucune autre conformation de cycle n'est observée en dessous de 25 kJ/mol, et c'est seulement au-dessus que des conformations de type 1S_3 , 1C_4 sont observées pour l'anomère α et des 1B_4 pour l'anomère β .

Seuls les spectres IR théoriques de la chaise 4C_1 avec une interaction entre l'hydroxyle en position 6 et celui en position 4 et du bateau 1B_4 ne possèdent pas de mode d'élongation des OH au-dessus de 3580 cm^{-1} . Toutefois, il est difficile d'attribuer le spectre expérimental à l'une ou l'autre de ces conformations à cause de la présence de nombreuses bandes OH liés et donc larges qui complexifient l'interprétation.

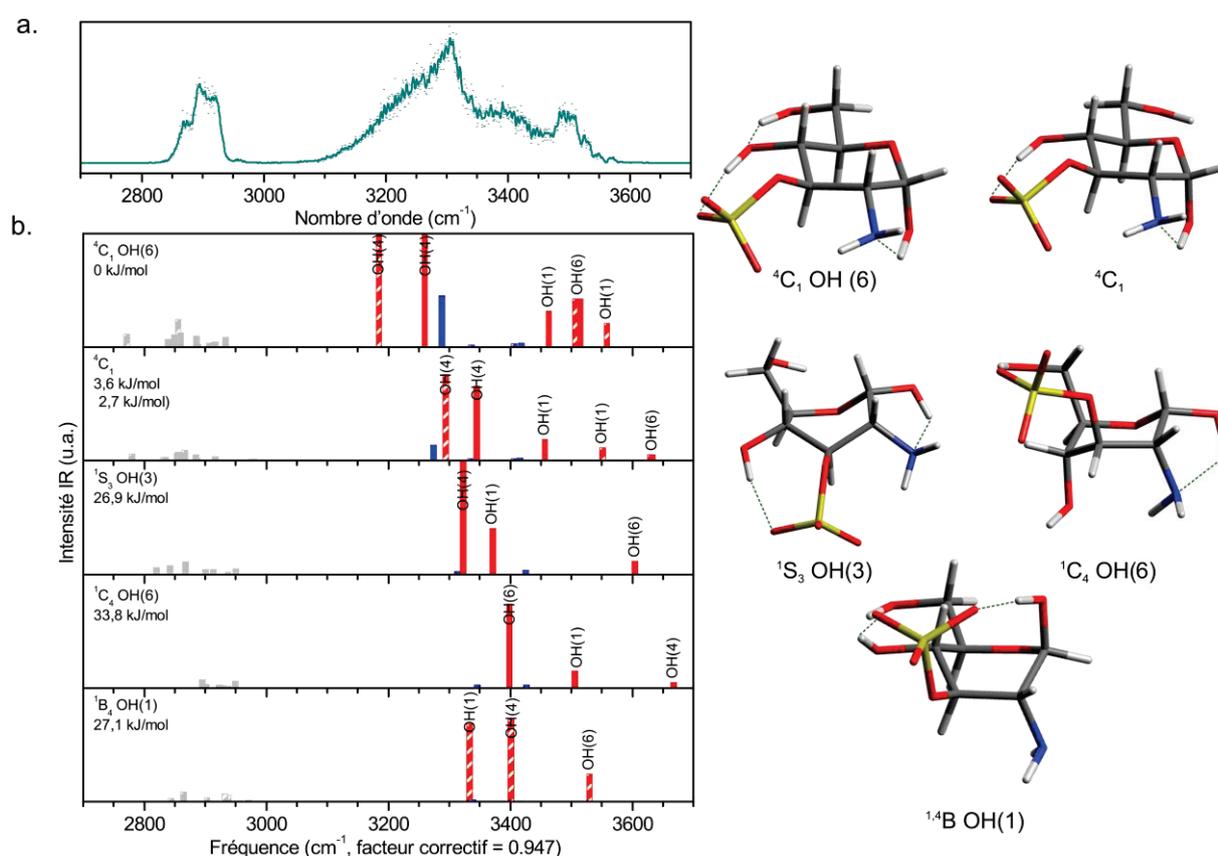


Figure 61 : Spectre IRMPD de la glucosamine 3-sulfate déprotonée (a) et les spectres IR théoriques (b) de différentes conformations du cycle obtenus par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd). Un facteur correctif de 0,947 est appliqué et un code couleur est attribué pour identifier les différents modes d'élongation : en gris sont représentés les modes CH, en bleu les modes NH, et en rouge les modes OH du cycle osidique. Les modes de vibration des anomères β de conformation similaire à celles présentées pour l'anomère α sont hachurés.

2.2.4. Conclusion

Il est possible grâce au couplage développé à Lyon de réaliser des spectres IRMPD de molécules déprotonées sans la nécessité d'irradier pendant de longues périodes ou d'ajouter un laser CO_2 pour assister la fragmentation. Ce type de spectre est particulièrement pertinent pour étudier des

molécules biologiques possédant une fonction sulfate ou un acide carboxylique, se déprotonant naturellement.

Il est possible de différencier des isomères de position tels que la glucosamine 6-sulfate et la glucosamine 3-sulfate sous leur forme déprotonée grâce à leur spectre IRMPD. Ces résultats sont essentiels pour l'analyse de nombreuses biomolécules qu'elles soient sulfatées ou facilement déprotonables. Toutefois, en utilisant les mêmes méthodes de recherche conformationnelle et les mêmes standards de calculs théoriques que pour des molécules protonées, les spectres théoriques calculés ne correspondent pas aux spectres IRMPD expérimentaux. L'absence de modes d'élongation des O-H libres dans le spectre expérimental pose une question sur la localisation de la charge dans le cas de molécules sulfatées et déprotonées mais aussi sur la conformation adoptée par l'hexose déprotoné en phase gazeuse. Enfin, la présence de nombreuses bandes liées rend difficile l'identification de la structure de la molécule grâce à des calculs DFT statiques.

La différenciation des spectres IRMPD expérimentaux de ces deux isomères de position, déprotonés sous leur forme biologique, ouvre la voie à l'utilisation du couplage de la spectrométrie de masse avec la spectroscopie vibrationnelle à des cas plus complexes. C'est le cas des disaccharides obtenus à partir de glycosaminoglycanes comme les héparines sulfatées ou les chondroïtines sulfatées où la position du sulfate a des rôles importants pour l'activité biologique de la molécule.

3. Application à l'analyse des glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes sont des polysaccharides constitués d'une répétition de disaccharides composés d'un acide hexuronique (acide D-glucuronique ou L-iduronique) et d'une N-acétyl hexosamine (N-acétyl glucosamine ou N-acétyl galactosamine). Ces polysaccharides sont exprimés à la surface des cellules des mammifères ou sont présents dans la matrice extracellulaire. Ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques comme la coagulation,[21] le développement cellulaire,[22] les interactions cellulaires,[23] l'inflammation,[24] les infections[25] ou le cancer.[26,27] Ces différents processus sont modulés par la présence de sulfatation à différentes positions sur les disaccharides : la sulfatation en position 3 est nécessaire à l'activité coagulante de l'héparine,[28] et le sulfate en position 6 permet le contrôle de la prolifération cellulaire.[29,30] Des motifs spécifiques de sulfatation ainsi que la présence d'un acide D-glucuronique ou L-iduronique jouent sur l'affinité et les interactions avec les protéines.[31]

Pour répondre à ces deux questions, c'est-à-dire localiser la position des sulfates et identifier la nature des acides hexuroniques, différentes méthodes basées sur la spectrométrie de masse[32–34] ont été développées. Elles impliquent un couplage avec des méthodes séparatives,[35–37] des méthodes de

fragmentation de type EDD (Electron Detachment Dissociation) ou IRMPD,[38–40] l'usage de la mobilité ionique[40–43] ou la réactivité des ions en phase gazeuse.[44] Toutefois ces différentes méthodes ne sont valables que pour des molécules référencées et ne permettent pas une extrapolation aux plus grands systèmes ou à des molécules similaires.

Dans le chapitre précédent, la question de l'identification de la nature de l'acide hexuronique a été traitée dans le cas de l'acide hyaluronique. Par la suite, la question de la localisation des sulfates sera traitée en étudiant trois classes de glycosaminoglycanes : le dermatane sulfate, la chondroïtine sulfate, et l'héparine.

3.1. Les héparines

L'unité de base d'une héparine est un disaccharide composé d'un acide hexuronique (acide D-glucuronique ou L-iduronique) lié à une N-acétyl glucosamine en position 4. En plus de cette chaîne répétitive, l'héparine est plus ou moins sulfatée en différentes positions : sur l'acide hexuronique en position 2, sur la N-acétyl glucosamine en position 3 ou 6, ou cette N-acétyl hexosamine peut perdre son acétylation et être à la place N-sulfatée.

Pour vérifier la sensibilité de la méthode, un disaccharide d'héparine non sulfaté et trois disaccharides d'héparine monosulfatés où le sulfate est localisé à différentes positions sont étudiés par spectroscopie infrarouge intégrée à la spectrométrie de masse dans la région $550\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ et dans la région $2800\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$. Ces différents disaccharides sont étudiés sous leur état de charge naturel, c'est-à-dire déprotonés. La figure 62 représente ces quatre molécules : $\Delta\text{UA-[1}\rightarrow\text{4]-GlcNAc}$ (Hp IV-A), $\Delta\text{UA-[1}\rightarrow\text{4]-GlcNS}$ (Hp IV-S), $\Delta\text{UA2S-[1}\rightarrow\text{4]-GlcNAc}$ (Hp III-A), $\Delta\text{UA-[1}\rightarrow\text{4]-GlcNAc6S}$ (Hp II-A).

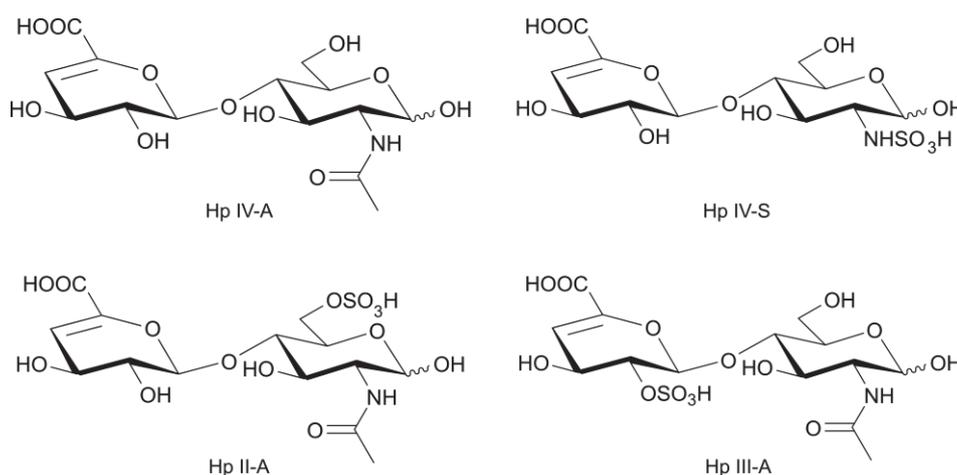


Figure 62 : Différents disaccharides d'héparine sans sulfate ou avec un sulfate en différentes positions

3.1.1. Spectre IRMPD dans la région 550-1750 cm^{-1}

La région 800-1700 cm^{-1} est particulièrement adaptée et utilisée pour obtenir des informations détaillées sur les molécules déprotonées en phase gazeuse. Par exemple, la localisation de la charge sur une molécule complexe telle qu'un disaccharide, qui possède à la fois une fonction carboxylique et une fonction sulfate, peut être facilement identifiée grâce au spectre IRMPD dans cette région spectrale qui comporte des bandes caractéristiques d'un carboxylate ou d'un sulfate déprotoné. Une bande est observée aux alentours de 1630 cm^{-1} dans le cas d'un carboxylate[14] et un motif de trois bandes est attendu pour un sulfate déprotoné autour de 1300, 1200 et 1000 cm^{-1} d'après ce qui a été obtenu sur les hexosamines sulfatées.

La figure 63 représente les spectres IRMPD de quatre disaccharides d'héparine (Hp II-A, Hp III-A, Hp IV-A, Hp IV-S) entre 550 et 1750 cm^{-1} . Les trois disaccharides sulfatés possèdent tous une signature différente dans la région étudiée, il est donc possible de distinguer des disaccharides dans cette gamme spectrale, contrairement au cas des monosaccharides sulfatés et déprotonés. Le spectre IRMPD du disaccharide non sulfaté est quant à lui facilement discernable des trois autres.

Pour Hp IV-A qui ne comporte aucun sulfate, le spectre IRMPD est composé de trois massifs entre 950 et 1750 cm^{-1} observés à 1639, 1318 et 1060 cm^{-1} . La bande à 1639 cm^{-1} est en accord avec une déprotonation en carboxylate[14] et n'est présente que pour Hp IV-A qui ne possède pas de fonction sulfate. Les spectres IRMPD des trois autres disaccharides sulfatés sont également constitués de trois bandes présentes à 1280, 1180 et 1031 cm^{-1} pour Hp II-A, à 1326, 1240 et 1034 cm^{-1} pour Hp III-A et à 1320, 1188 et 1040 cm^{-1} pour Hp IV-S. L'absence de bandes vers 1630 cm^{-1} et la présence de trois bandes aux alentours de 1300, 1200 et 1000 cm^{-1} suggère une déprotonation du disaccharide sur sa fonction sulfate.

Alors que les spectres IRMPD dans la région 950-1750 cm^{-1} des différents disaccharides sulfatés possèdent un motif similaire mais à des fréquences différentes, la région 550-950 cm^{-1} est, elle, très dépendante de la position de la fonction sulfate. Hp II-A est caractérisé par un motif dominé par une bande intense à 715 cm^{-1} et une bande de faible intensité à 578 cm^{-1} , le disaccharide Hp III-A est lui caractérisé par trois bandes distinctes observées à 755, 697 et 625 cm^{-1} et enfin, Hp IV-S est défini par trois bandes à 825, 760 et 718 cm^{-1} . Dans le cas plus particulier des disaccharides Hp II-A et Hp III-A, qui sont des isomères de position, cette gamme spectrale est composée d'une bande diagnostique pour chacun d'eux : à 1180 cm^{-1} pour Hp II-A et à 625 cm^{-1} pour Hp III-A.

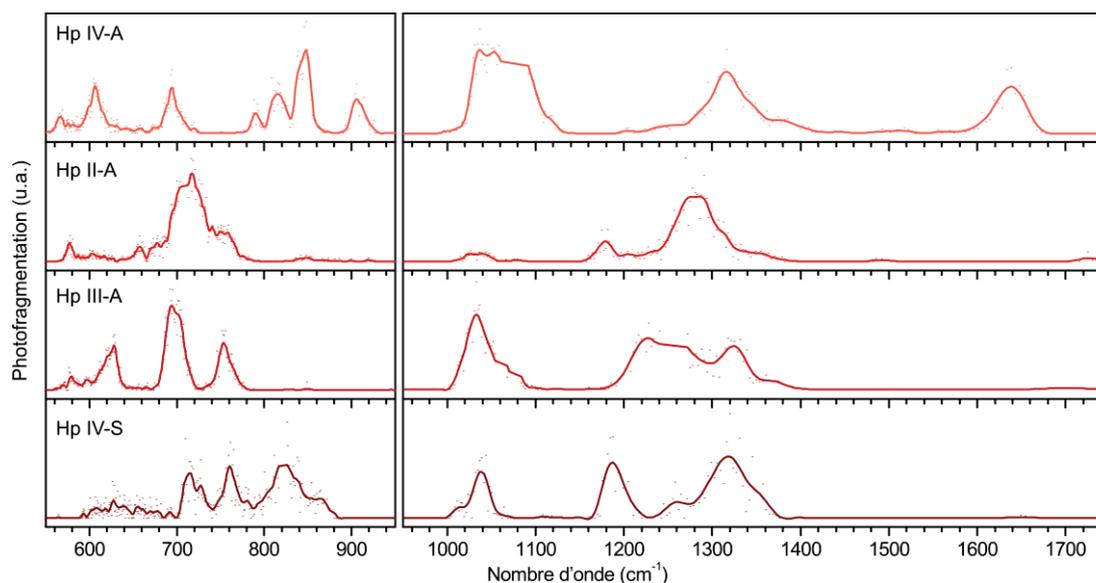


Figure 63 : Spectres IRMPD des disaccharides d'héparine sulfatée à différentes positions ou non sulfatée dans la gamme LEL. La région FELIX qui ne donnait pas d'information structurale dans le cas des monosaccharides est donc intéressante dans le cas de molécules plus complexes comme les disaccharides d'héparine sulfatée. Cette région permet de définir le site de déprotonation au niveau de la fonction sulfate du disaccharide et non sur la fonction carboxylique. Bien que le motif du sulfate déprotoné soit retrouvé sur les trois disaccharides sulfatés, la position exacte des bandes diffère et permet l'identification de ceux-ci. De plus, deux bandes diagnostiques ont été déterminées pour les deux isomères de position que sont les disaccharides Hp II-A et Hp III-A à 1180 et 625 cm^{-1} respectivement.

Le couplage de la spectrométrie de masse avec la spectroscopie infrarouge permet d'identifier la position de la fonction sulfate sur un disaccharide d'héparine dans la région 550-1750 cm^{-1} mais celle-ci n'étant accessible qu'auprès des centres laser à électrons libres, il est difficile d'implémenter cette technique pour l'analyse de routine. Il a donc été décidé d'étudier la sensibilité de cette méthode pour différencier ces isomères de position dans la gamme spectrale 2800-3700 cm^{-1} qui est accessible sur des instruments de laboratoire.

3.1.2. Spectre IRMPD dans la région 2800-3700 cm^{-1}

La figure 64 représente les spectres IRMPD des quatre disaccharides d'héparine précédents, entre 2800 et 3700 cm^{-1} . Une signature distincte est obtenue pour chacun des disaccharides, y compris pour les deux isomères de position Hp II-A et Hp III-A. Deux régions sont observées, entre 2800 et 3000 cm^{-1} , où sont retrouvés les modes d'élongation des C-H de la molécule, et au-dessus de 3000 cm^{-1} où sont observés les modes d'élongation O-H et N-H de celle-ci. Cette gamme spectrale ne comprend pas de modes propres à la fonction sulfate mais permet de sonder indirectement la position du sulfate grâce aux hydroxyles environnants. Dans le cas particulier des isomères de position Hp II-A et Hp III-A, les

spectres IRMPD sont différents et deux régions diagnostiques sont définies pour le disaccharide Hp II-A, permettant une identification rapide de la position de la fonction sulfate. Ces zones sont observées à 2912 et 3200 cm^{-1} .

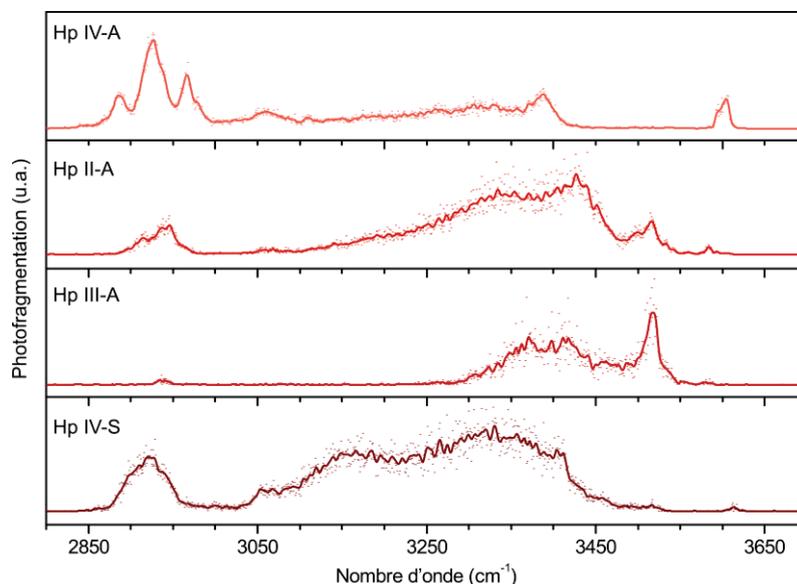


Figure 64 : Spectres IRMPD des disaccharides d'héparine dans la région OPO entre 2800 et 3700 cm^{-1}

La région 2800-3700 cm^{-1} accessible grâce à un laser de table est donc utile pour l'identification de la position de la fonction sulfate sur un disaccharide. De plus, la présence de zones diagnostiques permet d'envisager le couplage de la spectrométrie de masse à la spectroscopie laser comme une méthode de routine rapide pour l'analyse et l'identification de la position de sulfates sur des molécules d'intérêt biologique comme les héparines. Néanmoins, dans ce cas, on peut s'attendre à ce que les isomères de position observés pour les disaccharides d'héparine ne présentent pas de difficultés pour être identifiés par spectrométrie de masse puisque le sulfate est soit sur la *N*-acétyl glucosamine, soit sur l'acide hexuronique insaturé.

3.1.3. Limites de l'identification des isomères de position par MS/MS

Les spectres MS/MS des disaccharides Hp II-A et Hp III-A sont représentés sur la figure 65, et de nombreux fragments sont communs aux deux disaccharides comme les fragments de $m/z = 440, 396, 378, 360, 357, 342, 300$. Toutefois, chacun des disaccharides possède un fragment spécifique de sa structure, à $m/z = 199$ pour Hp II-A qui correspond à un fragment $Y_1^{0,2}A_2$ qui est spécifique d'un sulfate positionné sur le résidu *N*-acétyl glucosamine, et à $m/z = 237$ pour Hp III-A ce qui correspond à un fragment B_1 , spécifique d'un sulfate sur l'acide hexuronique insaturé. Ces fragments permettent donc d'identifier chacun des deux disaccharides sulfatés. À noter que le fragment de $m/z = 300$ correspond à un fragment Y_1 dans le cas de Hp II-A, et est censé être spécifique d'une sulfatation sur la *N*-acétyl glucosamine. Toutefois, ce fragment est également observé lors de la fragmentation de Hp III-A

suggérant soit une potentielle migration du sulfate d'un résidu à un autre, soit une contamination de l'échantillon. Ceci rend l'identification de ces disaccharides sulfatés par MS/MS ambiguë. De plus, pour d'autres glycosaminoglycanes comme les chondroïtines sulfates, où le sulfate est localisé à différentes positions sur la *N*-acétyl galactosamine, les fragmentations MS/MS sont ambiguës et ne permettent pas d'identifier la position de la fonction sulfate.

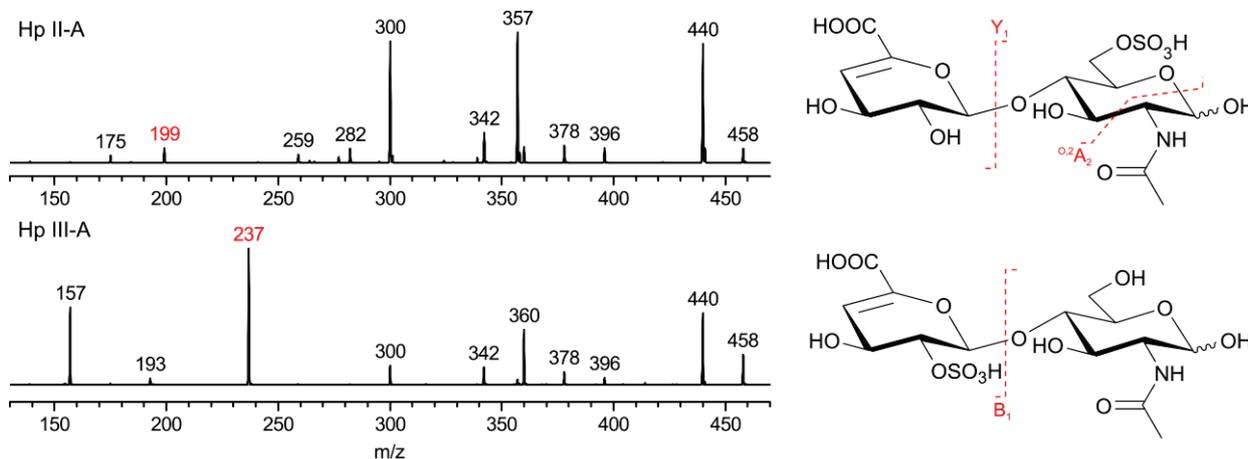


Figure 65 : Spectre MS/MS du disaccharide Hp II-A (haut) et de Hp III-A (bas)

3.2. Les chondroïtines sulfates: un cas compliqué

La chondroïtine sulfate a pour unité de base un disaccharide constitué d'un acide hexuronique (acide D-glucuronique ou L-iduronique) lié en position 3 à une *N*-acétyl galactosamine qui se lie en position 4 au prochain acide hexuronique. Ces disaccharides peuvent être sulfatés en position 2 de l'acide hexuronique ou en position 4 ou 6 la *N*-acétyl galactosamine.

L'analyse par spectrométrie de masse des chondroïtines sulfates est basée sur la comparaison des fragments obtenus avec ceux de standards. Deux disaccharides standards monosulfatés de chondroïtine sulfate sont présentés sur la figure 66 : Δ UA-[1→3]-GalNAc4S (CS-A) et Δ UA-[1→3]-GalNAc6S (CS-C). Ils ne diffèrent que par la position de la sulfatation qui peut intervenir soit sur le O4 soit sur le O6 de la *N*-acétyl galactosamine. Ces deux disaccharides possèdent des fragmentations MS/MS ambiguës dans la littérature et semblent dépendre des conditions de préparation des échantillons, de solutions ou de fragmentation.[45–47] Ces deux disaccharides sulfatés ont été obtenus auprès de deux fournisseurs différents afin d'identifier les signatures MS/MS et IRMPD de ceux-ci.

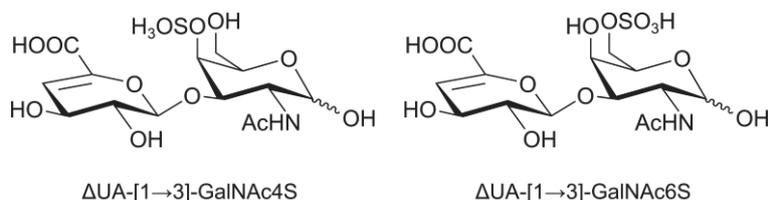


Figure 66 : Représentation des disaccharides $\Delta\text{UA-[1}\rightarrow\text{3]-GalNAc4S}$ (CS-A) et $\Delta\text{UA-[1}\rightarrow\text{3]-GalNAc6S}$ (CS-C)

3.2.1. Spectres MS/MS des disaccharides de référence CS-A et CS-C

3.2.1.1. Fournisseur 1 : CS-A (1) et CS-C (2)

La figure 67 montre les spectres MS/MS des deux disaccharides dérivés de chondroïtines sulfatées, CS-A et CS-C obtenus auprès du fournisseur 1. Ces disaccharides ne diffèrent que par la position du sulfate sur celui-ci, à savoir, sa position sur la *N*-acétyl galactosamine, en O4 ou O6, d'ailleurs différents fragments communs sont observés à $m/z = 342$, 300 et 282. Les fragments de $m/z = 300$ et 282 permettent de confirmer la présence du sulfate sur la *N*-acétyl galactosamine mais aucun fragment spécifique d'une des positions n'est observé. Le spectre MS/MS de CS-A comporte majoritairement le fragment de $m/z = 300$ ce qui correspond à une fragmentation de type Y_1 . Ce fragment est également observé sur le spectre MS/MS de CS-C mais dans de faibles proportions. Par contre, le spectre MS/MS de CS-C a pour pic le plus intense le fragment de $m/z = 282$. Cette fragmentation est identifiée comme étant de type Y_1/B_2 ce qui est classiquement observé dans le cas des oligosaccharides, comme décrit dans le chapitre précédent.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Leary *et al.*, [45] mais en désaccord avec ceux de Flangea *et al.* [47] Toutefois, la présence de $m/z = 300$ dans le spectre MS/MS de CS-A et de $m/z = 282$ dans celui de CS-C rendent l'utilisation de ces fragments compliqués puisque le ratio de l'un par rapport à l'autre peut dépendre des conditions expérimentales.

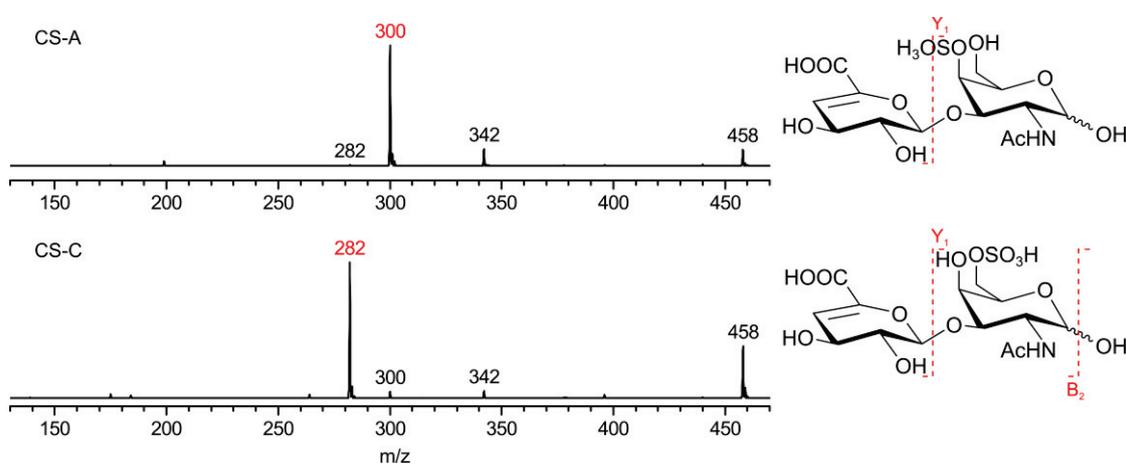


Figure 67 : Spectre MS/MS de disaccharides de chondroïtine sulfate, CS-A (haut) et CS-C (bas)

3.2.1.2. Fournisseur 2 CS-A (2) et CS-C (2)

Les spectres MS/MS des disaccharides CS-A et CS-C du fournisseur 2 sont décrits en figure 68. Le spectre de fragmentation de CS-A comporte majoritairement le fragment de $m/z = 300$. En revanche, le spectre MS/MS de CS-C contient à la fois les fragments $m/z = 282$ et $m/z = 300$.

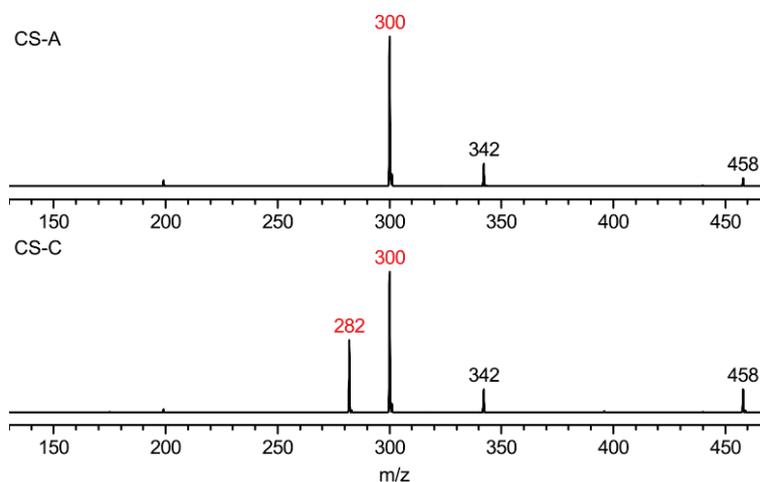


Figure 68 : Spectre MS/MS des disaccharides de chondroïtine sulfate, CS-A (haut) et CS-C (bas)

3.2.1.3. Comparaison

Pour CS-A, le spectre MS/MS obtenu pour les échantillons provenant des deux fournisseurs est identique avec un fragment de $m/z = 300$ largement majoritaire. Par contre, dans le cas de CS-C, les résultats sont contradictoires. Pour l'échantillon du fournisseur 1, le fragment de $m/z = 282$ est majoritaire et seulement un pic de faible intensité est observé à $m/z = 300$ alors que pour l'échantillon du fournisseur 2, le fragment majoritaire est celui de $m/z = 300$ même si un pic intense est toutefois observé à $m/z = 282$.

Ces deux fragments de $m/z = 282$ et 300 correspondent bien à une *N*-acétyl galactosamine monosulfatée déshydratée ou non, toutefois ces fragmentations ne sont pas spécifiques de l'une ou l'autre des positions possibles de sulfatation à savoir en O4 ou en O6. Il n'est donc pas possible de déterminer si chacune des espèces produit ces deux ions dans des proportions variables selon les conditions ou si les signatures MS/MS obtenues résultent de contaminations.

3.2.2. Spectre IRMPD des disaccharides de référence CS-A et CS-C dans la région 2800-3700 cm^{-1}

3.2.2.1. Fournisseur 1

La figure 69 représente les spectres IRMPD entre 2800 et 3700 cm^{-1} des disaccharides CS-A et CS-C. Ces spectres sont composés de deux régions distinctes, la première entre 2800 et 3000 cm^{-1} est composée de deux bandes à 2900 et 2953 cm^{-1} pour CS-A et d'une seule bande à 2933 cm^{-1} pour CS-C.

Dans la deuxième au-dessus de 3000 cm^{-1} , sont observés les modes d'élongation des O-H et des N-H de la molécule, et cette région est caractérisée par un motif étendu avec une intensité maximum observée à 3415 cm^{-1} pour CS-A et à 3375 cm^{-1} pour CS-C. Les spectres IRMPD de ces deux isomères de position dans cette région sont distincts, et permettent leur identification, toutefois, aucune bande diagnostique n'est observée dans la gamme spectrale $2800\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$.

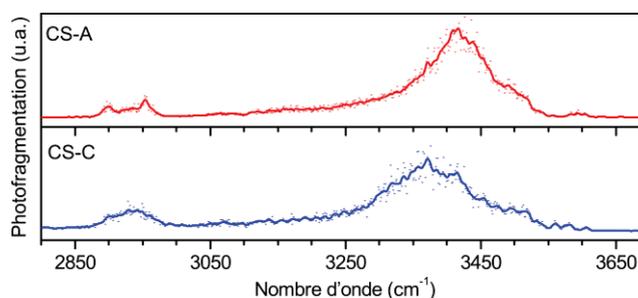


Figure 69 : Spectres IRMPD des disaccharides de chondroïtine sulfate CS-A (rouge) et CS-C (bleu) entre 2800 et 3700 cm^{-1} du fournisseur 1

3.2.2.2. Fournisseur 2

Les spectres IRMPD des disaccharides CS-A et CS-C du fournisseur 2 sont présentés en figure 70, et ont été réalisés entre 2800 et 3700 cm^{-1} . Ces spectres sont composés de deux régions distinctes, entre 2800 et 3000 cm^{-1} , deux bandes sont observées à 2900 et 2953 cm^{-1} pour les deux disaccharides et correspondent aux modes d'élongation des C-H de la molécule. Au-dessus de 3000 cm^{-1} , un motif étendu de modes d'élongation des O-H et des N-H est observé, le spectre IRMPD de CS-A possède un apex plus resserré présent à 3415 cm^{-1} alors que celui de CS-C est plus large et est situé à 3405 cm^{-1} .

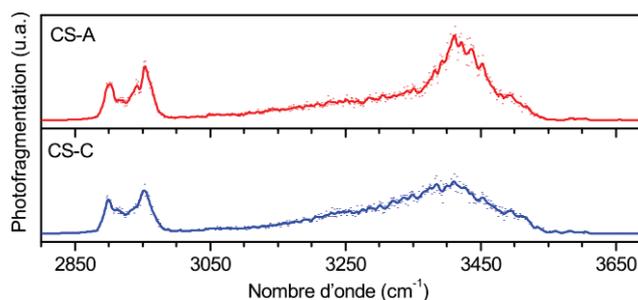


Figure 70 : Spectres IRMPD des disaccharides de chondroïtine sulfate CS-A (rouge) et CS-C (bleu) entre 2800 et 3700 cm^{-1} du fournisseur 2

3.2.2.3. Comparaison

Les spectres IRMPD des échantillons de CS-A obtenus par les deux fournisseurs sont similaires, seule une plus faible intensité au niveau des C-H est observée, mais le motif reste identique. Ceci peut s'expliquer par des conditions laser légèrement différentes. Par contre, les spectres IRMPD des échantillons de CS-C obtenus par les deux fournisseurs sont différents. L'apex de la bande large est

décalé d'environ 30 cm^{-1} et le motif C-H est composé d'une bande large pour le fournisseur 1 et de deux bandes pour le fournisseur 2.

Il convient de noter que les isomères de position que sont les disaccharides monosulfatés Hp II-A, Hp III-A, CS-A et CS-C ont chacun un spectre IRMPD distinct dans la région $2800\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$, ce qui permet de les identifier. Toutefois, dans le cas des disaccharides de chondroïtine sulfate, les spectres IRMPD sont très similaires et aucune bande diagnostique et spécifique de CS-A ou CS-C n'est observée. La position du sulfate en O4 ou en O6 est donc difficile à déterminer. D'autres possibilités d'états de charge sont cependant envisageables pour tenter d'amplifier la résolution spectroscopique en utilisant un autre état de charge comme doublement déprotoné, ou avec un adduit NH_4^+ . Ci-dessous est présentée une alternative basée sur la méthode de séquençage présentée dans le chapitre I et qui consiste à réaliser le spectre IRMPD de chacun des fragments correspondant à la *N*-acétyl galactosamine afin d'identifier la position du sulfate.

3.2.3. Séquençage

3.2.3.1. Différence entre *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate et *N*-acétyl galactosamine 6-sulfate

Avant de pouvoir réaliser le séquençage de ces disaccharides, il est nécessaire de réaliser les spectres IRMPD de référence de la *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate et de la *N*-acétyl galactosamine 6-sulfate ainsi que de leur équivalent déshydraté. Ces spectres IRMPD diffèrent selon la position du sulfate et sont représentés sur la figure 71.

Le spectre IRMPD de la *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate est composé entre 2700 et 3700 cm^{-1} de deux régions. L'une entre 2800 et 3000 cm^{-1} , où trois bandes résolues correspondant aux modes d'élongation des C-H sont observées à 2850 , 2898 , et 2954 cm^{-1} . L'autre région, entre 3100 et 3550 cm^{-1} , contient un motif composé d'une bande intense observée à 3410 cm^{-1} . Le spectre IRMPD de la *N*-acétyl galactosamine 6-sulfate est quant à lui composé de deux bandes partiellement résolues dans la région des modes d'élongation des C-H à 2905 et 2942 cm^{-1} et d'un motif complexe entre 3000 et 3600 cm^{-1} contenant plusieurs massifs distincts à 3050 , 3350 , 3429 et 3520 cm^{-1} .

Le spectre IRMPD de la *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate déshydratée est composé de deux bandes résolues entre 2700 et 3000 cm^{-1} correspondant aux modes d'élongation C-H et sont observées à 2884 et 2945 cm^{-1} . Un motif étendu est observé entre 3000 et 3600 cm^{-1} avec un maximum d'intensité observé à 3385 cm^{-1} . Le spectre IRMPD de la *N*-acétyl galactosamine 6-sulfate déshydratée est quant à lui beaucoup plus simple avec deux bandes fines observées à 2882 et 2938 cm^{-1} , et une bande étendue avec un maximum d'intensité à 3295 cm^{-1} .

Les spectres IRMPD de la *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate et de la *N*-acétyl galactosamine 6-sulfate sont discernables, tout comme ceux de leur équivalent déshydraté. Il est donc possible de déterminer la position du sulfate en position 4 ou en position 6 sur une *N*-acétyl galactosamine ou son équivalent déshydraté. Ceci permet d'identifier par séquençage, la position du sulfate sur un disaccharide de chondroïtine sulfate.

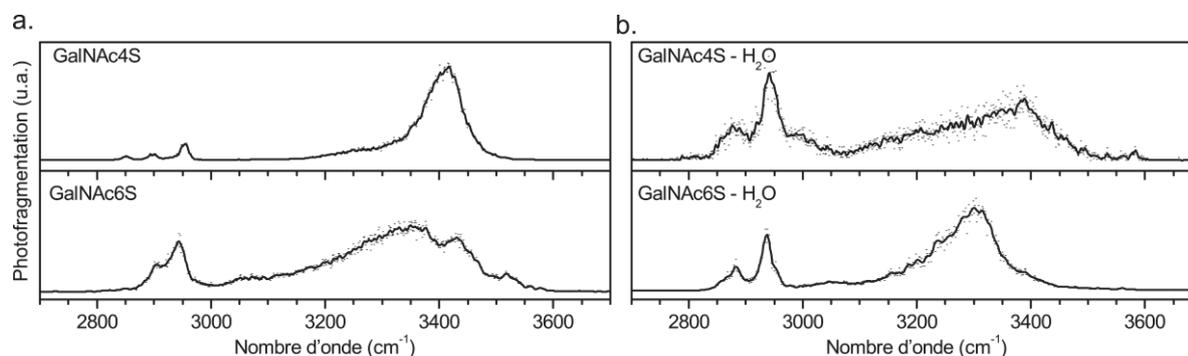


Figure 71 : spectres IRMPD de référence de la *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate et 6-sulfate (a) ainsi que de leurs équivalents déshydratés (b)

3.2.3.2. Analyse des fragments des disaccharides CS-A et CS-C

Afin de confirmer la nature des échantillons de disaccharides CS-A et CS-C obtenus auprès des deux fournisseurs, les deux fragments obtenus à $m/z = 282$ et $m/z = 300$ à partir de ces disaccharides sont analysés par MS/IR. Le spectre IRMPD de chacun de ces fragments est reporté en figure 72 entre 2700 et 3700 cm^{-1} , et comparé aux spectres IRMPD de référence de la *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate et 6-sulfate ou de leur équivalent déshydraté.

Dans le cas du disaccharide de CS-A, où les spectres MS/MS et IRMPD sont identiques pour les deux fournisseurs, la vérification de la position du sulfate n'a été effectuée que sur l'un des échantillons. Les spectres IRMPD des fragments $m/z = 300$ et $m/z = 282$ correspondent aux spectres IRMPD de la *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate et de son équivalent déshydraté. Le disaccharide fourni par les fournisseurs correspond bien à $\Delta\text{UA-[1}\rightarrow\text{3)]-GalNAc4S}$.

Par contre, pour le disaccharide de CS-C du fournisseur 2, le spectre IRMPD du fragment de $m/z = 282$ est identifié comme étant comparable à celui d'une *N*-acétyl galactosamine 6-sulfate déshydratée, alors que celui du fragment de $m/z = 300$ correspond à une *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate. L'échantillon de CS-C du fournisseur 2 est donc identifié comme un mélange des deux disaccharides de chondroïtine sulfate : $\Delta\text{UA-[1}\rightarrow\text{3)]-GalNAc4S}$ et $\Delta\text{UA-[1}\rightarrow\text{3)]-GalNAc6S}$.

Enfin dans le cas du disaccharide de CS-C du fournisseur 1, le spectre IRMPD du fragment de $m/z = 282$ correspond bien au spectre de référence de la *N*-acétyl galactosamine 6-sulfate déshydratée. De même, le fragment de $m/z = 300$ est attribué à une *N*-acétyl galactosamine 6-sulfate par comparaison

avec les spectres IRMPD de référence. Le disaccharide obtenu auprès du fournisseur 1 correspond donc bien à Δ UA-[1 \rightarrow 3]-GalNAc6S.

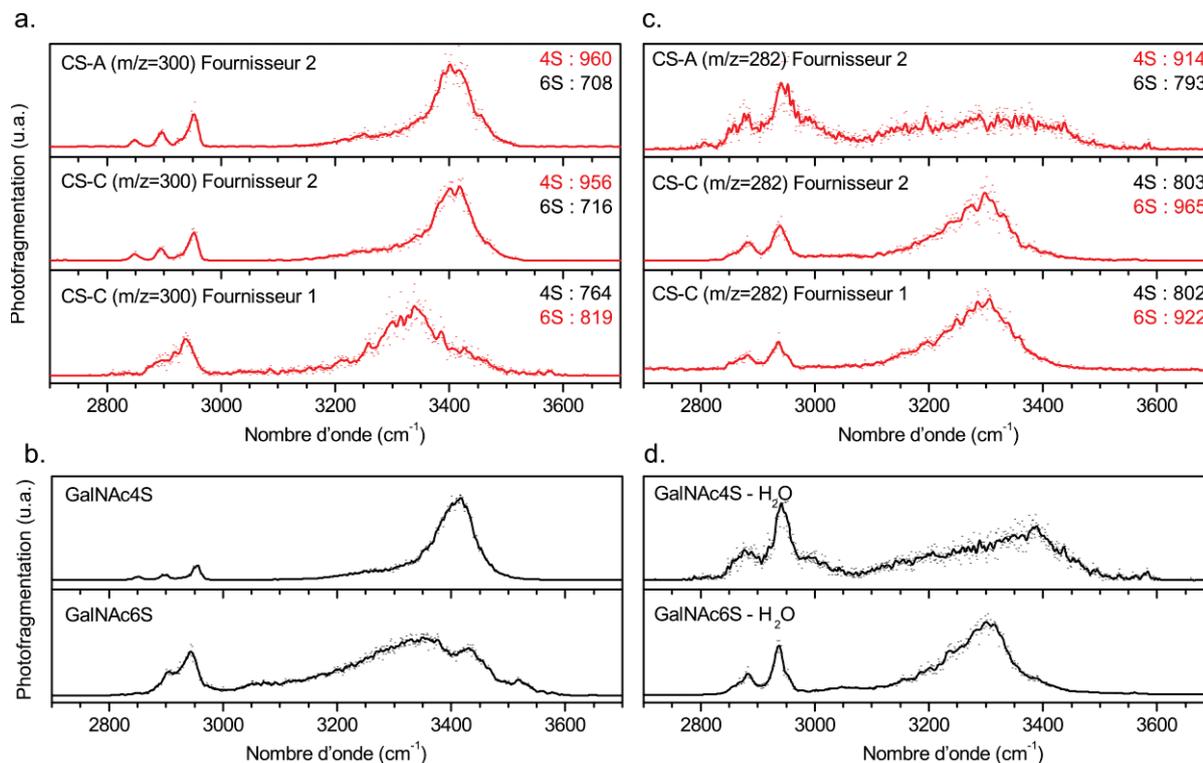


Figure 72 : a) les spectres IRMPD des fragments de m/z = 300 obtenus par fragmentation de CS-A et CS-C ; b) spectres IRMPD des références de *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate et 6-sulfate ; c) spectres IRMPD des fragments de m/z = 300 et m/z = 282 obtenus par fragmentation de CS-A et CS-C ; d) spectres IRMPD des références de *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate et 6-sulfate déshydratés.

3.2.4. Conclusion

Les spectres MS/MS de disaccharides de chondroïtine sulfate ne sont pas suffisamment informatifs pour identifier la position du sulfate sur la *N*-acétyl galactosamine puisque les fragments observés ne sont pas spécifiques. Il est donc difficile d'identifier la localisation du sulfate sur ces disaccharides par cette méthode, tout comme par leur spectre IRMPD car aucune bande spécifique ne permet de déterminer sans ambiguïté la position du sulfate. Pour vérifier la nature de ces disaccharides, une solution consiste à réaliser leur séquençage. Cette méthode permet d'identifier la position du sulfate sur la *N*-acétyl galactosamine à partir du spectre IRMPD du fragment correspondant au monosaccharide sulfaté ou à son équivalent déshydraté et en le comparant à des spectres IRMPD de référence pour les différentes positions.

Le séquençage des échantillons de référence par MS/IR a montré que la pureté des standards proposés par les fournisseurs est variable. Les échantillons de CS-A des deux fournisseurs ont été identifiés comme étant des disaccharides de chondroïtine dont le sulfate est en position 4, par contre pour les

échantillons de CS-C, celui du fournisseur 1 est constitué de celui dont le sulfate est en position 6 alors que pour le fournisseur 2, l'échantillon est constitué d'un mélange des deux disaccharides.

Enfin, la méthode de séquençage confirme que le fragment de $m/z = 282$ n'est pas spécifique de CS-C et que celui de $m/z = 300$ ne l'est pas plus pour CS-A, chacune des espèces produit les deux fragments dans des proportions variables selon les conditions expérimentales. Il n'est donc pas possible de se baser uniquement sur la présence ou non de ces fragments pour identifier la position du sulfate. En revanche, le séquençage permet d'identifier l'espèce ainsi que la présence de mélanges.

3.3. Séquençage d'un fragment de dermatane sulfate dp4

La méthode de séquençage a montré ses performances pour identifier la position d'un sulfate sur un disaccharide, là où la spectrométrie de masse seule donne des résultats non spécifiques. Dans le cas d'un oligosaccharide de plus grande taille, un tétrasaccharide disulfaté dans le cas suivant, il n'est pas possible de se baser sur les résultats de fragmentation MS/MS obtenus pour les disaccharides, et de nouvelles références sont nécessaires s'il y a besoin d'identifier la position des sulfates sur ce tétrasaccharide. En revanche, la méthode de séquençage par MS/IR ne nécessite pas de nouvelles références car elle se base sur l'analyse des spectres IRMPD des fragments de même taille que les monosaccharides sulfatés de référence étudiés précédemment.

3.3.1. Spectre de masse du tétrasaccharide

Pour valider la méthode de séquençage MS/IR sur un oligosaccharide de plus grande taille, un tétrasaccharide de séquence définie, $\Delta\text{UA}[1\rightarrow3]\text{GalNAc4S}\beta(1\rightarrow4)\text{IdoA}\alpha(1\rightarrow3)\text{GalNAc4S}$, a été utilisé. Le spectre de masse de l'échantillon ainsi que la structure du tétrasaccharide sont représentés en figure 73. Le tétrasaccharide est observé sous trois états de charge différents, $[\text{M}-\text{H}]^-$ de $m/z = 917$, $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ de $m/z = 458$ et $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$ de $m/z = 305$.

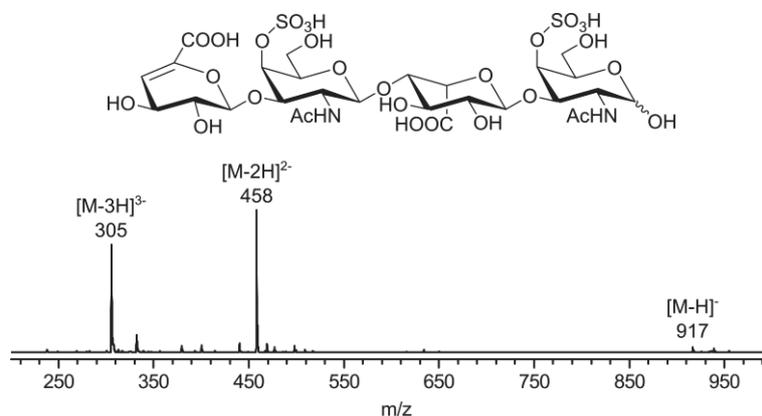


Figure 73 : structure du tétrasaccharide de dermatane sulfate : $\Delta\text{UA}[1\rightarrow3]\text{GalNAc4S}\beta(1\rightarrow4)\text{IdoA}\alpha(1\rightarrow3)\text{GalNAc4S}$

3.3.2. Fragmentations du tétrasaccharide

Afin de déterminer la position des sulfates sur les *N*-acétyl galactosamine du tétrasaccharide, il est nécessaire d'obtenir par fragmentation la *N*-acétyl galactosamine située à l'extrémité réductrice et d'isoler celle du côté non réducteur. Dans le cas où les fragmentations du tétrasaccharide ne permettraient pas de les obtenir, il est également possible d'analyser leur équivalent déshydraté. Pour les obtenir, les différents états de charge observés lors du spectre de masse peuvent être utilisés. Comme l'intensité du signal pour la forme $[M-H]^-$ est très faible dans ces conditions, cet état de charge n'a pas été choisi pour obtenir les fragments d'intérêt.

3.3.2.1. Forme $[M-3H]^{3-}$

Le spectre MS/MS du tétrasaccharide sous sa forme $[M-3H]^{3-}$ est représenté sur la figure 74. Deux fragments intéressants pour identifier la *N*-acétyl galactosamine sulfatée en position réductrice sont obtenus, le fragment Y_1 de $m/z = 300$ qui correspond au monosaccharide sulfaté entier et le fragment Y_1/B_4 qui correspond à la forme déshydratée. Ensuite, pour obtenir la *N*-acétyl galactosamine sulfatée du côté non réducteur, il est nécessaire de réaliser une étape MS supplémentaire. Deux fragments intenses contiennent le résidu d'intérêt, le fragment Y_3 de $m/z = 379$ et le fragment B_2 de $m/z = 440$. Toutefois, le fragment Y_3 contient les deux résidus sulfatés à chacune de ses extrémités, ce qui entraîne un mélange de ces deux résidus sulfatés lors la fragmentation suivante. Le fragment B_2 ne pouvant contenir que le résidu sulfaté situé du côté non réducteur, il a donc été isolé puis fragmenté. Son spectre de fragmentation représenté sur la figure 74 est composé d'un fragment majoritaire B_2/Y_3 , identifié comme étant le résidu sulfaté déshydraté situé du côté non réducteur.

En utilisant la forme $[M-3H]^{3-}$ du tétrasaccharide, il est possible d'obtenir séquentiellement les deux résidus sulfatés d'intérêt : le fragment Y_1 pour le résidu à l'extrémité réductrice et le fragment B_2/Y_3 pour l'autre résidu sulfaté.

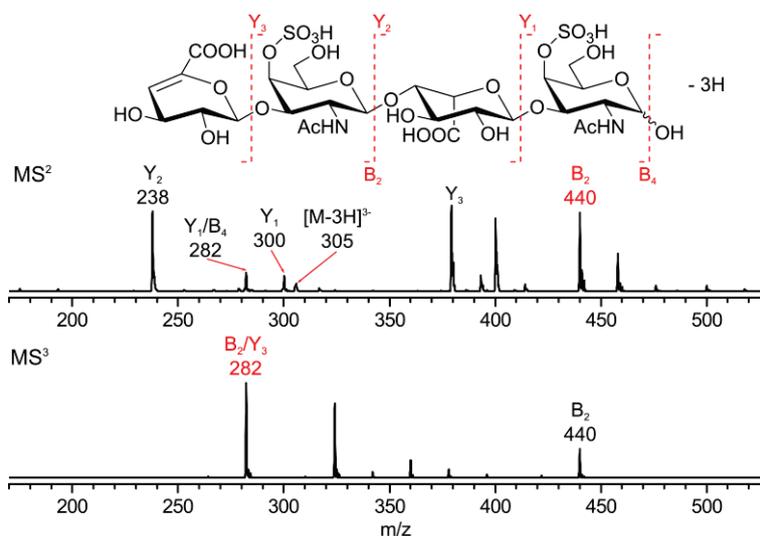


Figure 74 : spectre de fragmentation de $[M-3H]^{3-}$ et du fragment B_2 obtenu lors de l'étape précédente

3.3.2.2. Forme $[M-2H]^{2-}$

Le spectre MS/MS du tétrasaccharide sous sa forme $[M-2H]^{2-}$ est représenté sur la figure 75. Les fragments majoritairement observés correspondent au fragment Y_1 identifié comme le résidu sulfaté à l'extrémité réductrice ainsi qu'au fragment complémentaire B_3 . Pour obtenir le deuxième résidu d'intérêt, il est possible d'utiliser soit le même chemin MS^n que pour la forme $[M-3H]^{3-}$ soit le fragment B_3 qui contient également ce résidu. Toutefois, une étape supplémentaire d'isolation serait alors nécessaire.

En utilisant la forme $[M-2H]^{2-}$ du tétrasaccharide, seul le résidu sulfaté situé à l'extrémité réductrice peut être obtenu dans des conditions de signal suffisant.

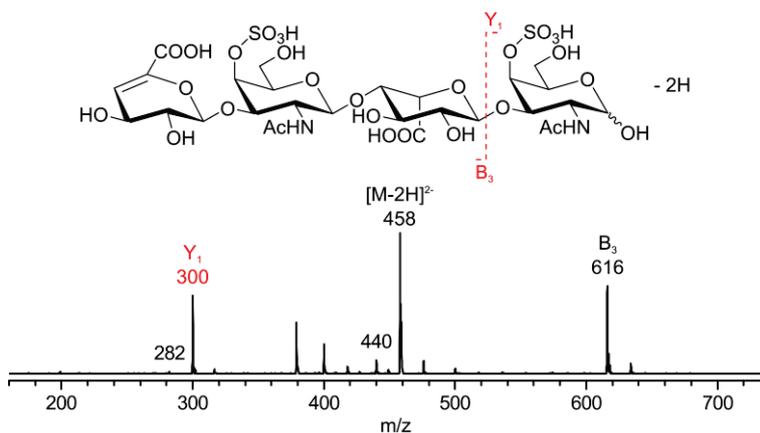


Figure 75 : spectre MS/MS de $[M-2H]^{2-}$

3.3.2.3. Sélection des fragments à analyser par MS/IR

Sur des critères d'intensité de signal, le fragment sélectionné pour identifier la position du sulfate sur la *N*-acétyl galactosamine à l'extrémité réductrice est le fragment Y_1 obtenu par fragmentation de la

forme $[M-2H]^{2-}$. Pour identifier la position du sulfate sur l'autre *N*-acétyl galactosamine, le fragment B_2/Y_3 de la forme $[M-3H]^{3-}$ a été sélectionné.

3.3.3. Spectres IRMPD des fragments et comparaison aux références

Après avoir isolé le fragment Y_1 obtenu à partir de la forme $[M-2H]^{2-}$, son spectre IRMPD a été réalisé et reporté sur la figure 76. Il est composé de trois bandes à 2852, 2898 et 2951 cm^{-1} dans la région des modes C-H et d'une bande intense observée à 3410 cm^{-1} . Par comparaison avec les références, ce spectre IRMPD est attribué à celui d'une *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate.

Le spectre IRMPD du fragment B_2/Y_3 de la forme $[M-3H]^{3-}$ est représenté sur la figure 76. Il est composé de deux bandes à 2897 et 2946 cm^{-1} dans la région des modes C-H et d'une bande intense observée à 3385 cm^{-1} . Cette bande intense correspond exactement à la position du maximum d'intensité de la bande large du spectre de référence de la *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate déshydratée, en revanche un décalage de 90 cm^{-1} vers les plus hautes énergies est observé par rapport à la bande intense du spectre de référence de la *N*-acétyl galactosamine 6-sulfate déshydratée. Sur ces critères de position de la bande principale, le spectre IRMPD du fragment B_2/Y_3 de la forme $[M-3H]^{3-}$ est attribué à celui d'une *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate déshydratée.

Les deux résidus sulfatés sont identifiés comme étant des *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate. La méthode de séquençage par MS/IR a bien permis de retrouver la position des sulfates sur le tétrasaccharide confirmant ainsi sa séquence : $\Delta\text{UA}[1\rightarrow3]\text{GalNAc4S}\beta(1\rightarrow4)\text{IdoA}\alpha(1\rightarrow3)\text{GalNAc4S}$.

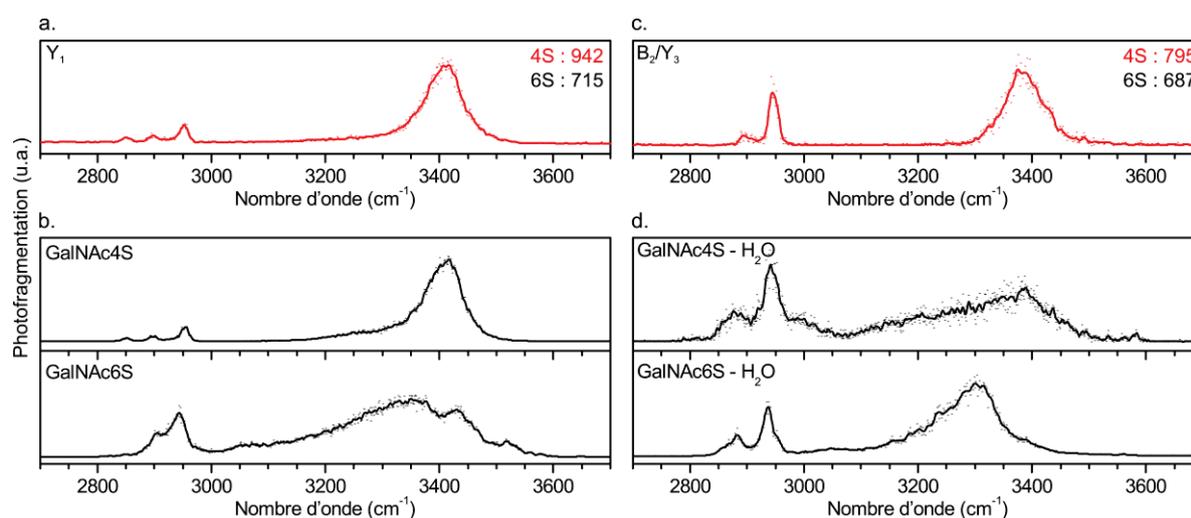


Figure 76 : a) Spectre IRMPD du GalNAc sulfaté obtenu à partir du fragment Y_1 ; c) Spectre IRMPD du GalNAc sulfaté déshydraté obtenu à partir du fragment B_2/Y_3 ; b) Spectres IRMPD de référence des *N*-acétyl galactosamine 4-sulfate ; d) Spectres IRMPD de référence des *N*-acétyl galactosamine 6-sulfate ainsi que leur équivalent déshydraté

3.4. Conclusion

L'utilisation de la spectroscopie infrarouge intégrée à la spectrométrie de masse permet d'obtenir une observable supplémentaire aux fragmentations ou à la mobilité ionique pour l'identification de la position des sulfates dans des fragments de glycosaminoglycanes. La région $550-1750\text{ cm}^{-1}$ permet d'obtenir des informations sur la localisation de la charge sur le disaccharide, confirmant une déprotonation sur le sulfate ou dans le cas de disaccharides non sulfatés sur l'acide carboxylique. Quant à elle, la région $2700-3700\text{ cm}^{-1}$ est caractérisée par des motifs larges et complexes qui permettent néanmoins de différencier les différents isomères de position malgré l'absence de bandes spécifiques pour chacune des positions.

Cette gamme spectrale ($2700-3700\text{ cm}^{-1}$) permet d'identifier facilement la position du sulfate sur les disaccharides de chondroïtine sulfate grâce à leur signature infrarouge intrinsèque. Par contre, celle-ci n'est pas adaptée à l'étude d'un mélange de ces isomères à cause de l'absence de bandes spécifiques et ne permet pas de combler les limitations des méthodes de fragmentation. Toutefois, d'autres états de charge peuvent cependant être explorés pour améliorer la résolution spectroscopique. En revanche, le séquençage par MS/IR permet d'identifier chacun des fragments utiles observés en spectrométrie de masse afin de déterminer la composition en disaccharides sulfatés. Cette méthode a permis d'identifier les fragments obtenus par MS/MS dans le cas de disaccharides sulfatés, et d'identifier la position de leur sulfate. De plus, cette méthode est utilisable sur des oligosaccharides de plus grande taille là où les autres méthodes nécessitent de nouveaux standards ; ceci a été démontré en identifiant la position des sulfates sur chaque *N*-acétyl galactosamine d'un tétrasaccharide.

4. Bibliographie

1. Mann, M.; Jensen, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 255–261.
2. Yu, H.; Chen, X. Carbohydrate post-glycosylational modifications. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 865.
3. Muthana, S. M.; Campbell, C. T.; Gildersleeve, J. C. Modifications of Glycans: Biological Significance and Therapeutic Opportunities. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 31–43.
4. Defaus, S.; Gupta, P.; Andreu, D.; Gutiérrez-Gallego, R. Mammalian protein glycosylation – structure versus function. *The Analyst* **2014**, *139*, 2944.
5. Higashi, H.; Hirabayashi, Y.; Fukui, Y.; Naiki, M.; Matsumoto, M.; Ueda, S.; Kato, S. Characterization of N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 3796–3802.
6. Mann, B.; Klussmann, E.; Vandamme-Feldhaus, V.; Iwersen, M.; Hanski, M.-L.; Riecken, E.-O.; Buhr, H. J.; Schauer, R.; Kim, Y. S.; Hanski, C. Low O-acetylation of sialyl-LE_x contributes to its overexpression in colon carcinoma metastases. *Int. J. Cancer* **1997**, *72*, 258–264.
7. Hutchins, J. T.; Reading, C. L.; Giavazzi, R.; Hoaglund, J.; Jessup, J. M. Distribution of mono-, di-, and tri-O-acetylated sialic acids in normal and neoplastic colon. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 483–489.
8. Perepelov, A. V.; Shekht, M. E.; Liu, B.; Shevelev, S. D.; Ledov, V. A.; Senchenkova, S. N.; L'vov, V. L.; Shashkov, A. S.; Feng, L.; Aparin, P. G.; Wang, L.; Knirel, Y. A. *Shigella flexneri* O-antigens revisited: final elucidation of the O-acetylation profiles and a survey of the O-antigen structure diversity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2012**, *66*, 201–210.
9. Gama, C. I.; Tully, S. E.; Sotogaku, N.; Clark, P. M.; Rawat, M.; Vaidehi, N.; Goddard, W. A.; Nishi, A.; Hsieh-Wilson, L. C. Sulfation patterns of glycosaminoglycans encode molecular recognition and activity. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 467–473.
10. KAMERLING, J. P.; SCHAUER, R.; SHUKLA, A. K.; STOLL, S.; HALBEEK, H.; VLIEGENTHART, J. Migration of O-acetyl groups in N, O-acetylneuraminic acids. *Eur. J. Biochem.* **1987**, *162*, 601–607.
11. Kenny, D. T.; Issa, S. M. A.; Karlsson, N. G. Sulfate migration in oligosaccharides induced by negative ion mode ion trap collision-induced dissociation: Migration of sulfate. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 2611–2618.
12. Lewis, A. L.; Nizet, V.; Varki, A. Discovery and characterization of sialic acid O-acetylation in group B *Streptococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 11123–11128.
13. Wight, C. A.; Beauchamp, J. L. Infrared spectra of gas-phase ions and their use in elucidating reaction mechanisms. Identification of C₇H₇⁺ structural isomers by multiphoton electron detachment using a low-power infrared laser. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6499–6501.
14. Oomens, J.; Steill, J. D. Free Carboxylate Stretching Modes. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 3281–3283.
15. Oomens, J.; Steill, J. D.; Redlich, B. Gas-Phase IR Spectroscopy of Deprotonated Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4310–4319.
16. Steill, J. D.; Oomens, J. Gas-Phase Deprotonation of *p*-Hydroxybenzoic Acid Investigated by IR Spectroscopy: Solution-Phase Structure Is Retained upon ESI. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13570–13571.
17. Crestoni, M. E.; Chiavarino, B.; Steinmetz, V.; Fornarini, S. Communication: Vibrational study of a benzyl carbanion: Deprotonated 2,4-dinitrotoluene. *J. Chem. Phys.* **2012**, *137*, 181101.
18. Almasian, M.; Grzetic, J.; van Maurik, J.; Steill, J. D.; Berden, G.; Ingemann, S.; Buma, W. J.; Oomens, J. Non-Equilibrium Isomer Distribution of the Gas-Phase Photoactive Yellow Protein Chromophore. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 2259–2263.
19. Schinle, F.; Jacob, C. R.; Wolk, A. B.; Greisch, J.-F.; Vonderach, M.; Weis, P.; Hampe, O.; Johnson, M. A.; Kappes, M. M. Ion Mobility Spectrometry, Infrared Dissociation Spectroscopy, and ab Initio Computations toward Structural Characterization of the Deprotonated Leucine-Enkephalin Peptide Anion in the Gas Phase. *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118*, 8453–8463.
20. Paciotti, R.; Coletti, C.; Re, N.; Scuderi, D.; Chiavarino, B.; Fornarini, S.; Crestoni, M. E. Serine O-sulfation probed by IRMPD spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 25891–25904.

21. Casu, B.; Guerrini, M.; Torri, G. Structural and conformational aspects of the anticoagulant and antithrombotic activity of heparin and dermatan sulfate. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 939–950.
22. Haltiwanger, R. S.; Lowe, J. B. Role Of Glycosylation In Development. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 491–537.
23. Couchman, J. R. Transmembrane Signaling Proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 89–114.
24. Taylor, K. R.; Gallo, R. L. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* **2006**, *20*, 9–22.
25. Hallak, L. K.; Collins, P. L.; Knudson, W.; Peebles, M. E. Iduronic Acid-Containing Glycosaminoglycans on Target Cells Are Required for Efficient Respiratory Syncytial Virus Infection. *Virology* **2000**, *271*, 264–275.
26. Yip, G. W.; Smollich, M.; Götte, M. Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 2139–2148.
27. Afratis, N.; Gialeli, C.; Nikitovic, D.; Tsegenidis, T.; Karousou, E.; Theocharis, A. D.; Pavão, M. S.; Tzanakakis, G. N.; Karamanos, N. K. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J.* **2012**, *279*, 1177–1197.
28. Lindahl, U.; Bäckström, G.; Thunberg, L.; Leder, I. G. Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77*, 6551–6555.
29. Sugaya, N.; Habuchi, H.; Nagai, N.; Ashikari-Hada, S.; Kimata, K. 6-O-Sulfation of Heparan Sulfate Differentially Regulates Various Fibroblast Growth Factor-dependent Signalings in Culture. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 10366–10376.
30. Vivès, R. R.; Seffouh, A.; Lortat-Jacob, H. Post-Synthetic Regulation of HS Structure: The Yin and Yang of the Sulfs in Cancer. *Front. Oncol.* **2014**, *3*.
31. Kreuger, J. Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *J. Cell Biol.* **2006**, *174*, 323–327.
32. Staples, G. O.; Zaia, J. Analysis of Glycosaminoglycans Using Mass Spectrometry. *Curr. PROTEOMICS* **2011**, *8*, 325–336.
33. Wuhrer, M. Glycomics using mass spectrometry. *Glycoconj. J.* **2013**, *30*, 11–22.
34. Kailemia, M. J.; Ruhaak, L. R.; Lebrilla, C. B.; Amster, I. J. Oligosaccharide Analysis by Mass Spectrometry: A Review of Recent Developments. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 196–212.
35. Staples, G. O.; Bowman, M. J.; Costello, C. E.; Hitchcock, A. M.; Lau, J. M.; Leymarie, N.; Miller, C.; Naimy, H.; Shi, X.; Zaia, J. A chip-based amide-HILIC LC/MS platform for glycosaminoglycan glycomics profiling. *PROTEOMICS* **2009**, *9*, 686–695.
36. Sun, X.; Li, L.; Overdier, K. H.; Ammons, L. A.; Douglas, I. S.; Burlew, C. C.; Zhang, F.; Schmidt, E. P.; Chi, L.; Linhardt, R. J. Analysis of Total Human Urinary Glycosaminoglycan Disaccharides by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6220–6227.
37. Huang, R.; Zong, C.; Venot, A.; Chiu, Y.; Zhou, D.; Boons, G.-J.; Sharp, J. S. De Novo Sequencing of Complex Mixtures of Heparan Sulfate Oligosaccharides. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 5299–5307.
38. Oh, H. B.; Leach, F. E.; Arungundram, S.; Al-Mafraji, K.; Venot, A.; Boons, G.-J.; Amster, I. J. Multivariate Analysis of Electron Detachment Dissociation and Infrared Multiphoton Dissociation Mass Spectra of Heparan Sulfate Tetrasaccharides Differing Only in Hexuronic acid Stereochemistry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22*, 582–590.
39. Leach, F. E.; Arungundram, S.; Al-Mafraji, K.; Venot, A.; Boons, G.-J.; Amster, I. J. Electron detachment dissociation of synthetic heparan sulfate glycosaminoglycan tetrasaccharides varying in degree of sulfation and hexuronic acid stereochemistry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, *330–332*, 152–159.
40. Kailemia, M. J.; Park, M.; Kaplan, D. A.; Venot, A.; Boons, G.-J.; Li, L.; Linhardt, R. J.; Amster, I. J. High-Field Asymmetric-Waveform Ion Mobility Spectrometry and Electron Detachment Dissociation of Isobaric Mixtures of Glycosaminoglycans. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *25*, 258–268.
41. Seo, Y.; Andaya, A.; Leary, J. A. Preparation, Separation, and Conformational Analysis of Differentially Sulfated Heparin Octasaccharide Isomers Using Ion Mobility Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2416–2423.

-
42. Harvey, D. J.; Scarff, C. A.; Crispin, M.; Scanlan, C. N.; Bonomelli, C.; Scrivens, J. H. MALDI-MS/MS with Traveling Wave Ion Mobility for the Structural Analysis of N-Linked Glycans. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 1955–1966.
43. Williams, J. P.; Grabenauer, M.; Holland, R. J.; Carpenter, C. J.; Wormald, M. R.; Giles, K.; Harvey, D. J.; Bateman, R. H.; Scrivens, J. H.; Bowers, M. T. Characterization of simple isomeric oligosaccharides and the rapid separation of glycan mixtures by ion mobility mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2010**, *298*, 119–127.
44. Ortiz, D.; Enjalbert, Q.; MacAleese, L.; Dugourd, P.; Salpin, J.-Y. Effects of calcium complexation on heparin-like disaccharides. A combined theoretical, tandem mass spectrometry and ultraviolet experiment: Calcium complexation of heparin-like disaccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2015**, *29*, 1135–1144.
45. Desaire, H.; Leary, J. A. Detection and quantification of the sulfated disaccharides in chondroitin sulfate by electrospray tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 916–920.
46. Zaia, J.; Costello, C. E. Compositional Analysis of Glycosaminoglycans by Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 233–239.
47. Flangea, C.; Serb, A. F.; Schiopu, C.; Tudor, S.; Sisu, E.; Seidler, D. G.; Zamfir, A. D. Discrimination of GalNAc (4S/6S) sulfation sites in chondroitin sulfate disaccharides by chip-based nanoelectrospray multistage mass spectrometry. *Cent. Eur. J. Chem.* **2009**, *7*, 752–759.

Chapitre IV

La spectroscopie IRMPD résolue en isomères et en conformères

Faits marquants

Spectroscopie dans l'infrarouge lointain (page 135)

Spectroscopie IRMPD résolue en anomère par spectroscopie IRMPD à 2 couleurs (page 144)

Spectroscopie IRMPD résolue en conformère par spectroscopie IRMPD à 2 couleurs (page 145)

HPLC/MS/IR résolue en isomère (page 147)

HPLC/MS/IR résolue en anomère (page 154)

La spectroscopie infrarouge en phase gazeuse permet d'obtenir une information précise sur la structure des ions isolés ce qui permet de distinguer de nombreux isomères tels que les chapitres précédents l'ont montré. De plus, les temps d'analyse atteints lors de cette thèse (inférieurs à 10 minutes) et de préparation des échantillons la rendent compatible avec des applications d'analyse en routine. La principale limitation de cette méthode est liée à l'impossibilité de séparer des molécules de même masse, que ce soit des isomères ou des conformations différentes. De ce fait, lorsqu'un mélange d'isomères est étudié, le spectre infrarouge entre 2700 et 3700 cm^{-1} peut très vite devenir encombré. En effet, le spectre IRMPD obtenu est alors la résultante de la contribution de chacun des isomères et il devient donc difficile de pouvoir identifier clairement la composition de cet échantillon. C'est pourquoi il est nécessaire de séparer les différentes formes isomériques en amont de leur analyse spectroscopique afin de pouvoir les identifier.

De nombreuses méthodes analytiques compatibles avec la spectrométrie de masse permettent de séparer des carbohydrates, notamment l'électrophorèse capillaire,[1–3] la chromatographie en phase gazeuse[4–6] ou encore la chromatographie liquide selon différents modes chromatographiques : HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)[7–9], HPAEC (High-Performance Anion-Exchange Chromatography)[10–12] ou phase inverse.[13,14] Toutefois la plupart de ces techniques nécessitent une dérivation chimique des espèces.[15,16] Plus récemment, les méthodes de mobilité ionique de type DIMS (Differential Ion Mobility Spectrometry),[17,18] TWIMS (Travelling-Wave Ion Mobility Spectrometry)[19–21] ou DTIMS (Drift-Tube Ion Mobility Spectrometry)[22–24] ont montré leur pouvoir séparatif sur des oligosaccharides.

D'un autre côté, il est également possible d'utiliser des schémas spectroscopiques résolus en conformères. C'est le cas notamment de la spectroscopie d'ions UV-IR réalisée dans le groupe de Thomas Rizzo ou Timothy Zwier,[25–28] pour laquelle la présence d'un chromophore sur la molécule est nécessaire, ce qui n'est pas propice à l'étude de carbohydrates non modifiés. Une autre possibilité est d'utiliser une spectroscopie infrarouge de prédissociation qui consiste à venir « tagger » la molécule piégée et refroidie avec un messenger, comme l'argon ou le dihydrogène. Dans ce cas, l'absorption d'un photon infrarouge est suffisant pour détacher le messenger de la molécule.[29–31] De plus, les molécules sont tellement refroidies qu'il est alors possible de figer leur conformation en phase gazeuse et de réaliser le spectre infrarouge d'une des conformations en utilisant une combinaison de deux lasers infrarouges OPO.[32,33]

Dans ce chapitre, le cas de la glucosamine sera étudié, et il sera démontré que même pour un monosaccharide, de nombreuses formes peuvent être présentes en phase gazeuse. Ensuite, deux méthodes permettant de sélectionner une conformation, un isomère ou un anomère seront

envisagées, la première en utilisant un équivalent de la spectroscopie infrarouge de prédissociation à deux couleurs, mais en utilisant la spectroscopie IRMPD, la seconde consistera à coupler la spectroscopie infrarouge intégrée à la spectrométrie de masse avec une méthode chromatographique.

1. La glucosamine : un cas modèle et complexe

1.1. Spectre IRMPD de la glucosamine entre 2800 et 3700 cm^{-1}

Le spectre IRMPD de la glucosamine est représenté entre 2800 et 3700 cm^{-1} sur la figure 77. Entre 2800 et 3100 cm^{-1} , deux bandes sont présentes à 2903 et 2952 cm^{-1} et sont classiquement observées sur les spectres IRMPD des hexosamines ou *N*-acétyl hexosamines et attribuées aux modes d'élongation des C-H. Une bande supplémentaire est également observée à 3055 cm^{-1} , celle-ci est étalée et peut être attribuée à un mode N-H lié. Entre 3100 et 3500 cm^{-1} , huit bandes sont observées à 3162, 3190, 3230, 3258, 3295, 3320, 3343 et 3424 cm^{-1} et forment un motif complexe. Enfin la dernière région, entre 3500 et 3700 cm^{-1} , comprend une bande à 3548 cm^{-1} correspondant à un O-H en liaison hydrogène faible et trois bandes résolues à 3615, 3638 et 3663 cm^{-1} attribuées à des O-H libres.

En omettant le motif CH peu spécifique, ce spectre IRMPD reste constitué de treize bandes alors que seulement sept modes de vibration sont attendus : quatre modes d'élongation O-H et trois modes d'élongation N-H. Comme vu précédemment, les carbohydrates existent en solution sous deux formes anomériques, α et β , pouvant expliquer ces bandes supplémentaires.

Pour vérifier cette hypothèse, la glucosamine a été méthylée en position 1 par voie chimique par Stéphane Chambert de l'Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires de Lyon, afin d'empêcher le phénomène de mutatoration. Des échantillons pur α méthyl glucosamine et pur β méthyl glucosamine ont été synthétisés et leur spectre IRMPD entre 2800 et 3700 cm^{-1} est reporté sur la figure 77. Entre 2800 et 3100 cm^{-1} , trois bandes sont observées pour l'anomère α , deux bandes C-H à 2915 et 2960 cm^{-1} et une bande N-H liée à 3056 cm^{-1} , alors que seulement les deux bandes C-H sont observées pour l'anomère β à 2895 et 2956 cm^{-1} . Entre 3100 et 3400 cm^{-1} , le spectre IRMPD de l'anomère α contient quatre bandes alors que celui de l'anomère β n'en contient que trois. Celles-ci sont observées à 3173, 3215, 3254 et 3343 cm^{-1} pour le premier et à 3241, 3297 et 3318 cm^{-1} pour le second. Enfin au-dessus de 3500 cm^{-1} , trois bandes sont observées pour les deux anomères, à 3552, 3615 et 3661 cm^{-1} pour l'anomère α et 3552, 3614 et 3669 cm^{-1} pour l'anomère β .

La combinaison des spectres IRMPD de l' α méthyl glucosamine et de la β méthyl glucosamine permet bien de reconstituer le spectre IRMPD de la glucosamine excepté la bande à 3638 cm^{-1} , grisée sur la figure 77, absente dans les versions méthylées en position 1. Cette bande du spectre IRMPD de la glucosamine peut ainsi être attribuée au mode O-H de l'hydroxyle situé en position 1. Le spectre IRMPD

de la β méthyl glucosamine comprend six modes de vibration OH et NH ce qui correspond à ce qui était attendu alors que celui de l' α méthyl glucosamine en contient neuf indiquant la présence de plusieurs conformations. Pour aller plus loin dans le détail des informations obtenues grâce au spectre IRMPD, il est nécessaire de comparer ces résultats à des spectres IR théoriques afin d'attribuer les conformations adoptées en phase gazeuse.

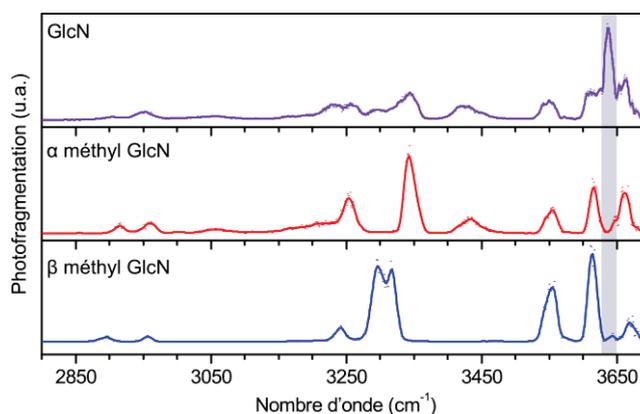


Figure 77 : spectres IRMPD de la glucosamine, α méthyl glucosamine et β méthyl glucosamine. La bande grise correspond au mode O-H de l'hydroxyle en position 1 qui est méthylé pour les versions pures en anomère

1.2. Comparaison expérience / théorie : anomère α

Comme pour les attributions réalisées dans les chapitres précédents, une recherche conformationnelle a été réalisée puis le spectre expérimental a été comparé aux spectres IR théoriques de différentes conformations. Deux d'entre elles permettent d'expliquer le spectre expérimental et sont montrées sur la figure 78 avec leur spectre IR.

La conformation de plus basse énergie est une chaise de type 1C_4 avec l'hydroxyle en position 3 en liaison hydrogène avec l'oxygène en position 6. La deuxième conformation, observée à 2 kJ/mol, est une chaise de type 4C_1 avec l'hydroxyle en position 4 en liaison hydrogène avec l'oxygène en position 6. Pour la conformation 1C_4 OH(3), les modes N-H sont observés à 3082, 3218 et 3346 cm^{-1} et les modes O-H à 3415 cm^{-1} et 3660 cm^{-1} où deux modes sont superposés. La forme 4C_1 OH(4) possède trois modes N-H observés à 3190, 3252 et 3332 cm^{-1} et trois modes O-H présents à 3556, 3622 et 3679 cm^{-1} .

En phase gazeuse, l' α méthyl glucosamine se retrouve sous deux conformations différentes : 1C_4 OH(3) et 4C_1 OH(4), ce qui permet d'expliquer les bandes supplémentaires observées dans le spectre IRMPD de cette molécule.

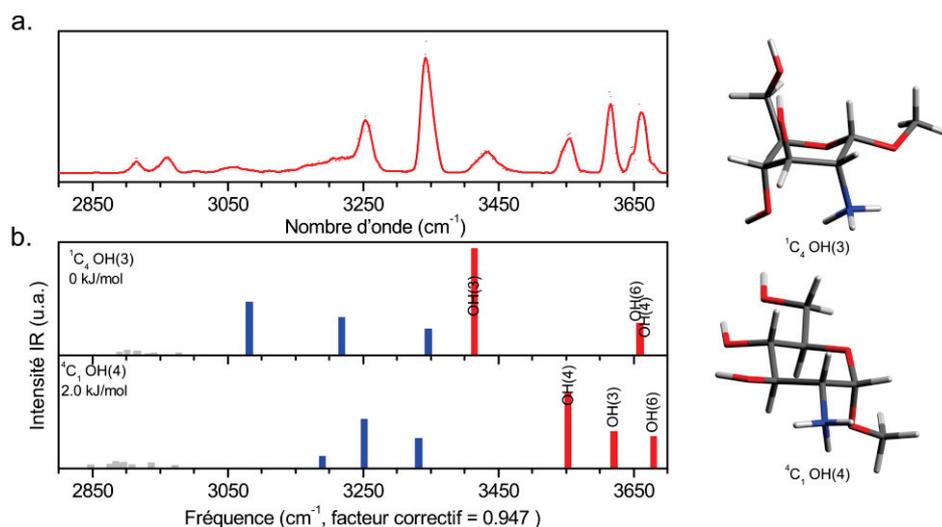


Figure 78 : spectre IRMPD de l' α méthyl glucosamine (a) comparé aux spectres IR théoriques (b) obtenus par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd) modifiés par un facteur correctif de 0,947. Un code couleur est attribué pour identifier les différents modes d'élongation : en gris sont représentés les modes CH, en bleu les modes NH, et en rouge les modes OH du cycle osidique

1.3. Comparaison expérience / théorie : anomère β

La même démarche a été appliquée pour la β méthyl glucosamine. Seule la forme 4C_1 OH(4) est observée à basse énergie et permet à elle seule d'expliquer le spectre. La forme 1C_4 OH(3) est toutefois observée à 26,5 kJ/mol et ces deux conformations sont représentées avec leur spectre IR théorique en figure 79.

La forme 1C_4 OH(3) ne correspond pas au spectre IRMPD avec notamment la présence d'un mode de vibration à 3438 cm^{-1} qui n'est pas présent expérimentalement. Par contre, le spectre IR théorique de la forme 4C_1 OH(4) contient trois modes N-H à 3225 , 3300 et 3318 cm^{-1} et trois modes O-H à 3556 , 3622 et 3679 cm^{-1} qui correspondent aux bandes observées sur le spectre IRMPD.

En phase gazeuse, la β méthyl glucosamine est observée sous une seule conformation, la forme 4C_1 OH(4). La forme 1C_4 OH(3) n'est pas observée pour l'anomère β , ceci peut s'expliquer d'un point de vue encombrement, l'hydroxyle en position 1 est en position axiale, tout comme l'hydroxyle en position 3 alors que pour la forme 4C_1 OH(4), tous les substituants du cycle sont en position équatoriale.

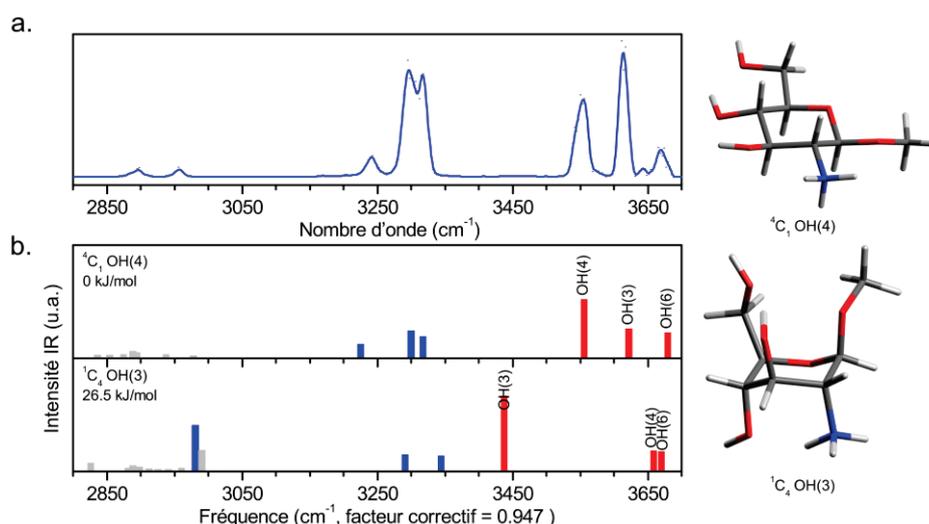


Figure 79 : spectre IRMPD de la β méthyl glucosamine (a) comparé aux spectres IR théoriques (b) obtenus par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd) modifiés par un facteur correctif de 0,947. Un code couleur est attribué pour identifier les différents modes d'élongation : en gris sont représentés les modes CH, en bleu les modes NH, et en rouge les modes OH du cycle osidique

1.4. Conclusion

Afin de vérifier si la méthylation n'a pas perturbé les conformations observées, une recherche conformationnelle sur les deux anomères de la glucosamine a été réalisée, et les spectres IR théoriques des formes sélectionnées précédemment sont reportés sur la figure 80. Les spectres IR théoriques des formes non méthylées sont similaires à ceux des formes méthylées et la forme 1C_4 OH(3) de l'anomère β est toujours observée à haute énergie (25,3 kJ/mol). De plus, la bande de l'hydroxyle en position 1 se retrouve autour de 3640 cm^{-1} pour chacun des spectres IR théoriques ce qui est cohérent avec la bande expérimentale du spectre IRMPD de la glucosamine observée à 3638 cm^{-1} . Ceci confirme l'attribution de la bande de l'hydroxyle en position 1 réalisée précédemment grâce à son absence sur les spectres IRMPD des formes méthylées.

En phase gazeuse, la glucosamine existe sous trois formes différentes : 4C_1 OH(4) et 1C_4 OH(3) pour l'anomère α et 4C_1 OH(4) pour l'anomère β . Des bandes caractéristiques de chacune des formes sont observées : la bande à 3424 cm^{-1} est spécifique de la forme 1C_4 OH(3) de l'anomère α , les bandes à 3295 et 3320 cm^{-1} ne sont observées que pour la forme 4C_1 OH(4) de l'anomère β et enfin, la bande à 3258 cm^{-1} est spécifique de la forme 4C_1 OH(4) de l'anomère α . Une bande à 3548 cm^{-1} est commune pour les deux anomères et caractéristique de la conformation chaise de type 4C_1 .

À partir d'un échantillon pur comme celui de la glucosamine, il est possible d'obtenir un spectre IRMPD complexe à interpréter, à la fois par la présence des deux anomères α et β mais aussi par la présence de différentes conformations comme les chaises 4C_1 et 1C_4 . Cet échantillon est un exemple simple illustrant la complexité des spectres IRMPD pour des carbohydrates. C'est pourquoi, dans le cas d'un

mélange d'isomères, il devient très difficile d'extraire des informations à partir du spectre IRMPD. Il est évident que simplifier les spectres IRMPD obtenus est nécessaire, pour cela nous verrons par la suite les différents moyens mis en œuvre. Nous étudierons d'autres gammes spectrales permettant d'avoir potentiellement des signaux plus simples et plus résolus, puis nous nous intéresserons à deux méthodes permettant de séparer des mélanges. Soit de façon spectroscopique en utilisant deux lasers, soit par couplage avec la chromatographie liquide haute performance.

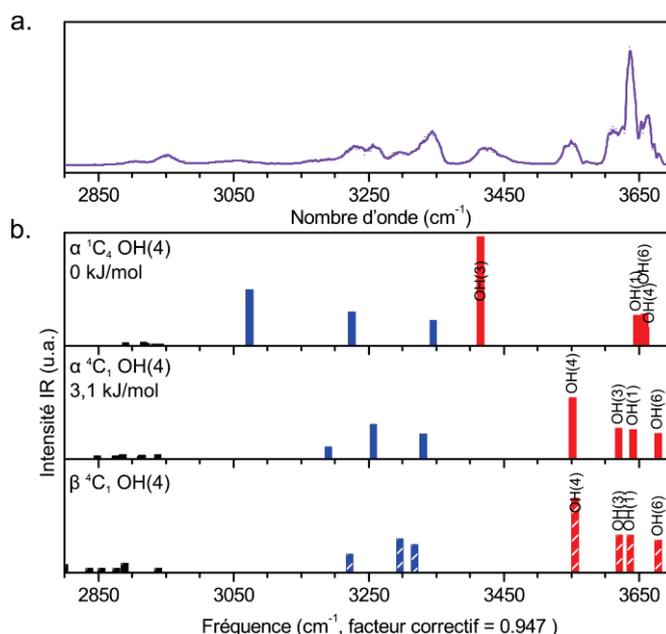


Figure 80 : spectre IRMPD de la glucosamine (a) comparé aux spectres IR théoriques (b) obtenus par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd) modifiés par un facteur correctif de 0,947. Un code couleur est attribué pour identifier les différents modes d'élongation : en gris sont représentés les modes CH, en bleu les modes NH, et en rouge les modes OH du cycle osidique. L'anomère β est représenté hachuré.

2. Spectroscopie dans l'infrarouge lointain

2.1. Comparaison de la glucosamine et de ses anomères α et β méthylés

2.1.1. Spectres IRMPD entre 700 et 1800 cm^{-1}

Les spectres IRMPD de la glucosamine et de ses anomères α et β méthylés ont été réalisés entre 700 et 1800 cm^{-1} grâce au couplage du LCQ avec FELIX décrit dans le chapitre 1 et sont représentés en figure 81. Ces trois spectres sont caractérisés par deux bandes autour de 1450 et 1600 cm^{-1} , d'un motif complexe entre 900 et 1200 cm^{-1} ainsi que très peu d'activité entre 1200 et 1400 cm^{-1} . Le spectre IRMPD de la glucosamine est constitué de trois bandes principales, la première est centrée autour de 1060 cm^{-1} , large de 150 cm^{-1} et possède un épaulement à 970 cm^{-1} . Les deux autres bandes sont résolues et observées à 1436 et 1598 cm^{-1} . Le spectre IRMPD de l' α méthyl glucosamine est composé d'un motif plus résolu entre 900 et 1200 cm^{-1} constitué de cinq bandes partiellement résolues et observées à 977, 1000, 1054, 1120 et 1185 cm^{-1} . À plus haute énergie, deux bandes sont observées à

1428 et 1574 cm^{-1} . Enfin, le spectre IRMPD de la β méthyl glucosamine possède un motif étendu entre 850 et 1200 cm^{-1} comprenant six bandes observées à 893, 948, 993, 1048, 1148 et 1182 cm^{-1} . Enfin, les deux bandes à haute énergie sont observées à 1447 et 1630 cm^{-1} .

La position de la bande autour de 1600 cm^{-1} varie selon les anomères et diffère de celle de la glucosamine. Ce mode de vibration est attribué à un mode de plissement NH dont la fréquence est modifiée par l'environnement proche, à savoir le méthyle en position 1. Les spectres des anomères α et β méthylés possèdent de nombreux points communs. Toutefois, certaines bandes proviennent majoritairement d'une contribution de l'anomère α comme à 1120 cm^{-1} où moins d'activité est observée pour l'anomère β . Une seule bande est spécifique d'une des formes, elle est observée à 893 cm^{-1} et n'est présente que dans le spectre IRMPD de la forme β méthyl glucosamine. En revanche, elle est absente du spectre IRMPD de la glucosamine, ce qui est en faveur d'une bande dépendant de la méthylation en position 1. Globalement, entre 1000 et 1500 cm^{-1} , les spectres de l' α et β méthyl glucosamine sont en accord avec le spectre IRMPD de la glucosamine.

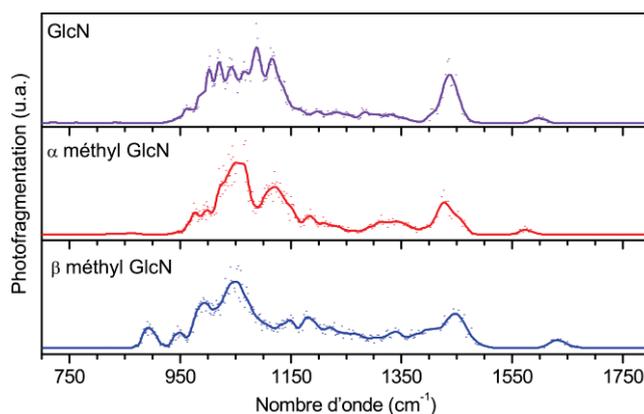


Figure 81 : spectres IRMPD entre 700 et 1800 cm^{-1} de la glucosamine et de ses anomères α et β méthylés

2.1.2. Spectres IRMPD entre 300 et 700 cm^{-1}

Les spectres IRMPD de la glucosamine et de ses anomères α et β méthylés sont représentés entre 300 et 700 cm^{-1} sur la figure 82. Ils sont caractérisés par une forte activité entre 300 et 420 cm^{-1} dont l'instabilité est causée par une perte d'intensité laser par absorption de celui-ci par l'eau atmosphérique avant son injection dans le spectromètre de masse. Cette région ne sera donc pas discutée en détail. Le spectre IRMPD de la glucosamine est composé entre 420 et 700 cm^{-1} d'un motif complexe constitué de quatre maxima locaux observés à 482, 553, 585 et 622 cm^{-1} . Le spectre IRMPD de l' α méthyl glucosamine est lui composé dans cette région de deux bandes observées à 484 et 535 cm^{-1} et cette dernière possède un épaulement centré à 565 cm^{-1} . Enfin le spectre IRMPD de la β méthyl glucosamine est composé d'une bande étalée de faible intensité à 456 cm^{-1} , et de deux bandes observées à 571 et 610 cm^{-1} .

Les spectres IRMPD de l' α et β méthyl glucosamine entre 300 et 700 cm^{-1} sont en accord avec celui de la glucosamine et une bande spécifique de chacun des anomères est présente dans cette région. Celle de l'anomère α est observée à 535 cm^{-1} et celle de l'anomère β est présente à 610 cm^{-1} .

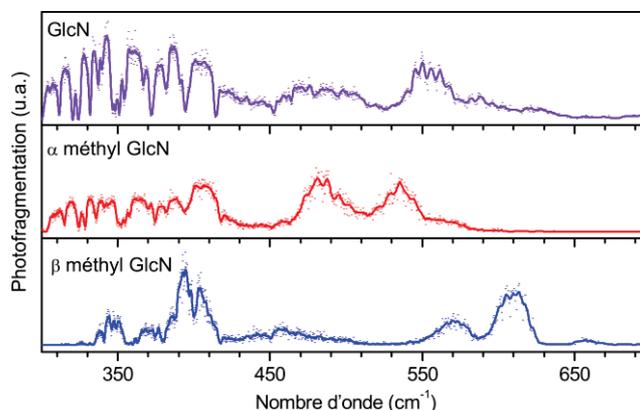


Figure 82: spectres IRMPD entre 300 et 700 cm^{-1} de la glucosamine et de ses anomères α et β méthylés

2.1.3. Spectres IRMPD entre 100 et 300 cm^{-1}

Les spectres IRMPD de la glucosamine et de ses anomères α et β méthylés sont représentés entre 100 et 300 cm^{-1} sur la figure 83. Aucune photofragmentation n'ayant été observée en dessous de 210 cm^{-1} , les spectres des anomères α et β méthylés n'ont pas été réalisés après 170 cm^{-1} . Ces trois spectres ont en commun une bande intense à 235 cm^{-1} possédant un faible épaulement à 222 cm^{-1} ainsi qu'une activité autour de 286 cm^{-1} . Le spectre IRMPD de la glucosamine est composé en plus d'un motif constitué de maxima peu résolus à 250, 260, 270 cm^{-1} . Celui de l'anomère α méthylé contient en supplément trois bandes à 250, 260 et 270 cm^{-1} et une bande de très faible intensité à 287 cm^{-1} alors que le spectre IRMPD de l'anomère β méthylé ne présente qu'en plus, une bande de faible intensité à 270 cm^{-1} .

Entre 200 et 300 cm^{-1} , deux bandes sont spécifiques de l'anomère α méthylé et sont observées à 250 et 260 cm^{-1} .

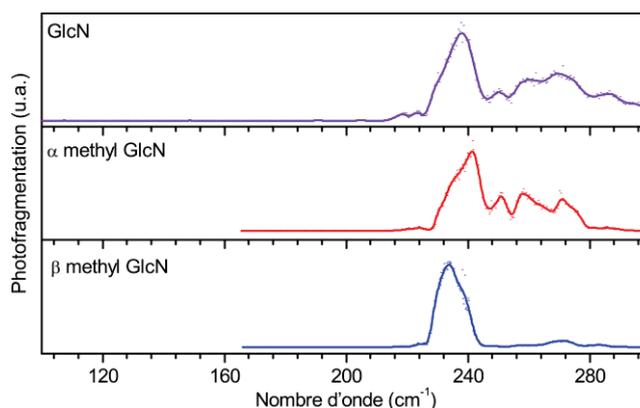


Figure 83 : spectres IRMPD entre 100 et 300 cm^{-1} de la glucosamine et de ses anomères α et β méthylés

2.2. Théorie ${}^4C_1/{}^1C_4$

2.2.1. Région 700-1800 cm^{-1}

Comme démontré dans la gamme 2800-3700 cm^{-1} , l' α méthyl glucosamine est présente en phase gazeuse sous la forme de deux conformères, la chaise 1C_4 OH(3) et la chaise 4C_1 OH(4). Les spectres IR théoriques de ces deux formes, représentés sur la figure 84, sont comparés au spectre IRMPD afin d'identifier des bandes spécifiques à l'une ou l'autre de ces conformations. Ces spectres IR théoriques sont, comme le spectre expérimental, composés d'un motif entre 900 et 1200 cm^{-1} constitués de nombreuses bandes, d'une zone de faible activité entre 1200 et 1400 cm^{-1} et de deux bandes résolues autour de 1450 et 1620 cm^{-1} . Dans les détails, le spectre IR de la forme 1C_4 OH(3) possède deux bandes intenses à 1052 et 1124 cm^{-1} pour lesquelles peu d'activité est observée dans le spectre IR de la forme 4C_1 OH(4). De même, la forme 4C_1 OH(4) possède deux bandes à 995 et 1088 cm^{-1} où aucun mode de vibration n'est observé pour la forme 1C_4 OH(3). Des modes de vibration spécifiques à la conformation 1C_4 OH(3) sont observés en dessous de 850 cm^{-1} mais aucune activité n'est observée sur le spectre IRMPD dans cette région.

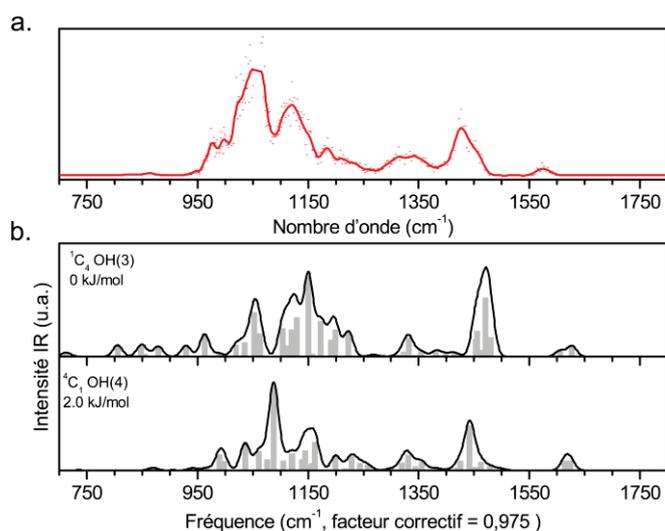


Figure 84 : spectre IRMPD de l' α méthyl glucosamine entre 700 et 1800 cm^{-1} (a) comparé aux spectres IR théoriques (b) obtenus par CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd). Un facteur correctif de 0,975 a été utilisé et les modes de vibration sont convolués par une gaussienne de 10 cm^{-1} de largeur à mi-hauteur.

2.2.2. Région 300-700 cm^{-1}

La région 300-700 cm^{-1} semble particulièrement adaptée pour différencier les deux conformations comme le montrent les spectres IR théoriques reportés sur la figure 85. En effet, le spectre IR de la forme ${}^1\text{C}_4$ OH(3) est caractérisé par deux bandes intenses dans cette région à 332 et 662 cm^{-1} alors que celui de la forme ${}^4\text{C}_1$ OH(4) les possède à 430 et 545 cm^{-1} . Malheureusement, l'accord entre l'expérience et la théorie n'est pas convaincant et ne permet pas d'attribuer les différentes bandes expérimentales à l'une ou l'autre des conformations.

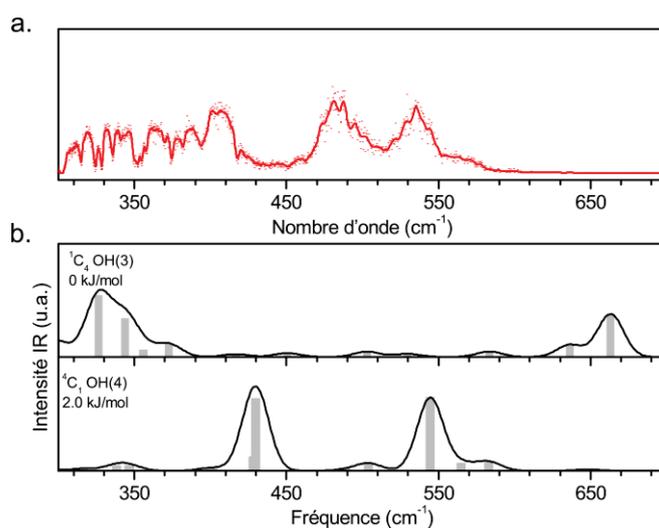


Figure 85 : spectre IRMPD de l' α méthyl glucosamine entre 300 et 700 cm^{-1} (a) comparé aux spectres IR théoriques (b) obtenus par CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd). Les modes de vibration sont convolués par une gaussienne de 10 cm^{-1} de largeur à mi-hauteur.

2.2.3. Région 100-300 cm^{-1}

Entre 100 et 300 cm^{-1} , là encore les spectres IR théoriques représentés sur la figure 86 ne permettent pas d'attribuer des bandes expérimentales à l'une ou l'autre des conformations.

Finalement, l'attribution de bandes spécifiques à l'une ou l'autre des deux conformations présentes en phase gazeuse s'avère plus difficile dans cette région qu'entre 2800 et 3700 cm^{-1} . En effet, entre 700 et 1800 cm^{-1} , les spectres IR sont globalement similaires et la seule zone de différenciation entre ces deux conformations se trouve entre 900 et 1200 cm^{-1} , dans une région spectrale congestionnée par de nombreux modes d'élongation C-O ou C-C. Toutefois, les bandes à 1052 et 1124 cm^{-1} semblent provenir majoritairement de la forme ${}^1\text{C}_4 \text{OH}(3)$ alors que les bandes à 995 et 1088 cm^{-1} sont plutôt caractéristiques de la forme ${}^4\text{C}_1 \text{OH}(4)$. En dessous de 700 cm^{-1} , de nombreuses bandes expérimentales sont bien définies, mais la comparaison avec la théorie dans cette région ne permet pas l'attribution de structures, en effet, la DFT conventionnelle éprouve des difficultés pour représenter correctement ces modes de basses énergies.[34]

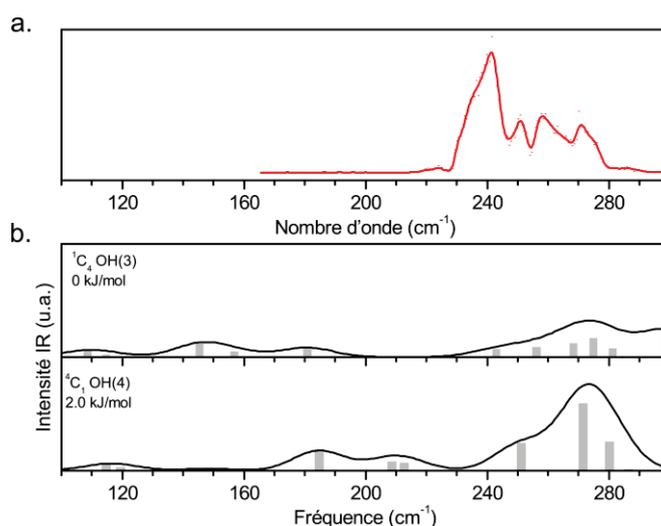


Figure 86 : spectre IRMPD de l' α méthyl glucosamine entre 100 et 300 cm^{-1} (a) comparé aux spectres IR théoriques (b) obtenus par CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd). Les modes de vibrations sont convolués par une gaussienne de 10 cm^{-1} de largeur à mi-hauteur.

2.3. Conclusion

Malgré une grande gamme spectrale étudiée, 100-1800 cm^{-1} , peu de bandes résolues et spécifiques d'une des formes sont présentes. La bande à 535 cm^{-1} est spécifique de l'anomère α de la glucosamine alors que les bandes observées à 610 et 893 cm^{-1} ne sont présentes que pour la forme β de la glucosamine. À noter que cette dernière bande est absente du spectre IRMPD de la glucosamine, celle-ci est donc liée à la méthylation en position 1.

Aucune bande n'appartenant qu'à l'une des conformations de l' α méthyl glucosamine n'a été identifiée, toutefois certaines bandes semblent avoir une composante importante de l'une ou l'autre de ces conformations. Toutefois dans la région autour de 1124 cm^{-1} , la forme ${}^1\text{C}_4\text{ OH}(3)$ est prédominante par rapport aux deux formes α et β ${}^4\text{C}_1\text{ OH}(4)$. Enfin, les bandes en dessous de 800 cm^{-1} n'ont pas pu être attribuées aux conformations de l'anomère α , puisque l'accord entre l'expérience et la théorie n'était pas suffisant dans cette gamme spectrale. Finalement, la réalisation de spectres IRMPD dans la région infrarouge lointain est un défi technique, puisqu'il est nécessaire d'utiliser des instruments de type laser à électrons libres mais aussi parce que la photofragmentation par IRMPD est plus difficile avec des photons de cette gamme spectrale qui sont beaucoup moins énergétiques. C'est également un défi théorique puisque les calculs conventionnels par DFT ne permettent pas d'interpréter correctement les spectres IRMPD en dessous de 800 cm^{-1} et d'autres approches théoriques basées sur la dynamique moléculaire sont développées pour cette gamme infrarouge. Des calculs théoriques réalisés sur la glucosamine en utilisant cette approche sont d'ailleurs en cours d'analyse.

Pour conclure, la région $100\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ comprend des bandes intéressantes pour distinguer les différentes formes de la glucosamine présentes en phase gazeuse, mais nécessite un instrument de grande ampleur qu'est un laser à électrons libres. De son côté, la région $2700\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$, permet de distinguer facilement les différentes formes présentes en phase gazeuse grâce à une comparaison avec les spectres IR théoriques sans nécessiter de lourde infrastructure, ce qui permet d'envisager son usage pour l'identification de composés en analyse de routine.

3. Spectroscopie d'extermination : 2 couleurs (IR lointain/proche IR)

La spectroscopie d'extermination consiste à photofragmenter totalement l'une des formes présente en phase gazeuse grâce à un premier laser à une longueur d'onde donnée, puis de réaliser le spectre IRMPD des formes restantes grâce au second laser. Il y a donc deux combinaisons possibles, soit la photofragmentation complète est réalisée par le laser FELIX et la spectroscopie avec l'OPO, soit l'inverse.

C'est une méthode spectroscopique qui permet de supprimer la contribution de l'une des formes en phase gazeuse afin d'obtenir le spectre IRMPD de la ou des formes restantes. Elle nécessite de connaître les bandes d'absorption spécifiques à cette forme afin de pouvoir la supprimer et bien qu'élégante du point de vue de la spectroscopie, cette technique est peu adaptée à l'analyse d'échantillons contenant de nombreuses formes.

3.1. Extermination d'une conformation à 3554 cm^{-1}

L'utilisation du laser OPO pour photofragmenter l'une des conformations lors de la première étape est un choix intéressant puisque la région $2700\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ contient des bandes spécifiques aux différentes formes de la glucosamine présentes en phase gazeuse. Comme vu précédemment, celle-ci possède autour de 3550 cm^{-1} une bande spécifique des anomères α et β de conformation de type ${}^4C_1\text{ OH}(4)$. En irradiant à 3554 cm^{-1} , ces formes se photofragmentent et seule la forme ${}^1C_4\text{ OH}(3)$ est sensée rester présente dans le piège.

Le spectre de masse de la glucosamine après irradiation à 3554 cm^{-1} est représenté sur la figure 87 et comparé au spectre de masse obtenu dans les mêmes conditions mais sans irradiation laser. Une partie de l'ion parent observé à $m/z = 180$ est photofragmentée en $m/z = 162$ ce qui correspond à une perte de molécule d'eau. Il est à noter que ce fragment est observé également sans irradiation et que seulement une très faible partie de la glucosamine est photofragmentée. Les spectres IRMPD de la glucosamine et de celle-ci après irradiation à 3554 cm^{-1} sont représentés sur la figure 87 entre 975 et 1225 cm^{-1} . Ces deux spectres sont identiques et sont constitués de cinq bandes partiellement résolues et observées autour de 1002 , 1030 , 1059 , 1095 et 1135 cm^{-1} .

Après irradiation à 3554 cm^{-1} , seule la forme ${}^1C_4\text{ OH}(3)$ est sensée être présente en phase gazeuse, pourtant les spectres IRMPD avec ou sans irradiation de la glucosamine sont identiques. Les conditions expérimentales ne permettent pas de photofragmenter suffisamment les conformations de type chaise 4C_1 de la glucosamine afin de réaliser le spectre IRMPD de la forme restante. C'est pourquoi, il a été choisi de modifier le schéma spectroscopique. La glucosamine est d'abord photofragmentée avec FELIX, puis la partie spectroscopie est réalisée avec le laser OPO. Puisque la glucosamine se fragmente naturellement dans nos conditions expérimentales de piégeage, la suite des expériences de spectroscopie à deux lasers se fera sur un mélange d' α méthyl glucosamine et de β méthyl glucosamine.

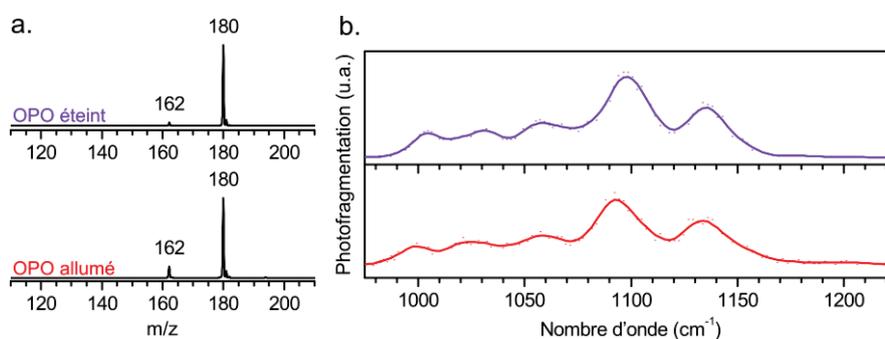


Figure 87 : spectre de masse (a) de la glucosamine avec (rouge) ou sans (violet) irradiation laser à 3554 cm^{-1} . Spectre IRMPD (b) entre 3200 et 3700 cm^{-1} de la glucosamine (violet) et de celle-ci après extermination des formes ayant une bande à 3554 cm^{-1} (rouge)

3.2. Extermination d'un anomère à 606 cm⁻¹

Le montage LCQ/FELIX/OPO ne permet pas d'observer de photofragmentation en dessous de 3200 cm⁻¹ par manque de puissance laser. Le spectre IRMPD d'un mélange d' α et β méthyl glucosamine a donc été réalisé entre 3200 et 3700 cm⁻¹ et représenté sur la figure 88. Celui-ci est similaire au spectre IRMPD de la glucosamine, excepté l'absence de la bande à 3638 cm⁻¹, attribuée à l'hydroxyle en position 1 qui se trouve méthylé dans le cas présent. Dans la région 3200-3400 cm⁻¹, les bandes observées à 3252 cm⁻¹ et 3341 cm⁻¹ sont attribuées à l'anomère α , et encadrent les bandes de l'anomère β présentes à 3298 et 3320 cm⁻¹. Ensuite est observé à 3432 cm⁻¹ la bande caractéristique de la forme ¹C₄ OH(3) puis à 3554 et 3613 cm⁻¹ les deux bandes diagnostiques des formes α et β ⁴C₁ OH(4). Enfin le massif autour de 3660 cm⁻¹ est composé des trois formes présentes en phase gazeuse.

Comme vu précédemment, la bande à 606 cm⁻¹ est spécifique de la β méthyl glucosamine, c'est donc une bande intéressante pour réaliser la spectroscopie d'extermination. À cette longueur d'onde, une partie des espèces du mélange est fragmentée comme observé sur le spectre de masse de la figure 88. En effet, la méthyl glucosamine de $m/z = 194$ donne lorsqu'elle est irradiée à 606 cm⁻¹ des fragments de $m/z = 162$ et 144 correspondant à la perte successive de CH₃OH et H₂O. Le spectre IRMPD des espèces restantes est réalisé entre 3200 et 3700 cm⁻¹ et représenté sur la figure 88. Celui-ci est similaire au spectre IRMPD du mélange sans irradiation au préalable, mais une baisse significative de l'intensité des bandes de l'anomère β est observée à 3298 et 3320 cm⁻¹.

Après irradiation à 606 cm⁻¹, le spectre IRMPD du mélange contient toujours les bandes caractéristiques de l'anomère β même si ces bandes sont moins intenses. Dans les conditions expérimentales de puissance laser et de durée d'irradiation du laser 1, il n'a pas été possible de fragmenter totalement l'anomère β à cette longueur d'onde. En effet, en-dessous de 700 cm⁻¹, la puissance laser est faible contrairement à la puissance laser obtenue dans la gamme 700-1800 cm⁻¹. Dans ces conditions, il a été choisi de réaliser les autres expériences de spectroscopie à deux couleurs uniquement dans la gamme 700-1800 cm⁻¹, la bande spécifique de l'anomère α à 535 cm⁻¹ n'a donc pas été exploitée.

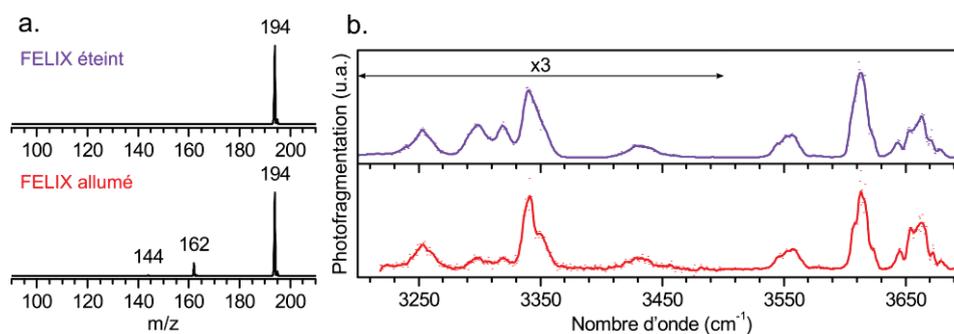


Figure 88 : spectre de masse (a) du mélange d' α et β méthyl glucosamine avec (rouge) ou sans (violet) irradiation laser à 606 cm^{-1} . Spectre IRMPD (b) entre 3200 et 3700 cm^{-1} du mélange d' α et β méthyl glucosamine (violet) et de ce mélange après extermination des espèces ayant une bande à 606 cm^{-1} (rouge)

3.3. Extermination d'un anomère à 893 cm^{-1}

D'après les spectres IRMPD réalisés précédemment dans la région $800\text{-}1800 \text{ cm}^{-1}$, une bande spécifique de l'anomère β méthylé de la glucosamine est observée à 893 cm^{-1} . Le spectre de masse représenté sur la figure 89, met en évidence une plus grande photofragmentation des espèces du mélange à cette longueur d'onde plutôt qu'à 606 cm^{-1} . En effet, les fragments de $m/z = 144$ et 162 sont nettement observables et un fragment supplémentaire de $m/z = 126$ est observé par rapport au spectre de photofragmentation réalisé avec irradiation à 606 cm^{-1} . Le spectre IRMPD du mélange d'anomères a donc été réalisé entre 3200 et 3700 cm^{-1} après irradiation préalable à 893 cm^{-1} . Il est représenté sur la figure 89, et est caractérisé par l'absence totale des bandes spécifiques de l'anomère β normalement observées à 3298 et 3320 cm^{-1} . Le reste du spectre IRMPD est équivalent à celui du mélange sans irradiation à l'exception d'une modification du rapport d'intensité entre les bandes observées à 3613 et 3660 cm^{-1} . Le spectre IRMPD ainsi obtenu est similaire au spectre de l' α méthyl glucosamine pure qui a été présenté précédemment.

En effet, dans le spectre IRMPD du mélange des anomères méthylés de la glucosamine, la bande à 3660 cm^{-1} est commune aux trois formes présentes en phase gazeuse alors que celle à 3613 cm^{-1} n'est présente que pour les anomères α et β de conformation 4C_1 . Après irradiation à 893 cm^{-1} , l'anomère β est absent, expliquant ainsi la diminution de l'intensité de la bande observée à 3613 cm^{-1} par rapport à celle à 3660 cm^{-1} .

Après irradiation à 893 cm^{-1} , le spectre IRMPD obtenu ne présente plus les bandes spécifiques de l'anomère β , cela signifie que celui-ci a été totalement fragmenté avant la réalisation du spectre IRMPD. Ceci confirme l'absence de mutarotation en phase gazeuse et démontre qu'il est possible grâce à l'utilisation de deux lasers infrarouges de réaliser sélectivement le spectre IRMPD de l'un des anomères d'un ose.

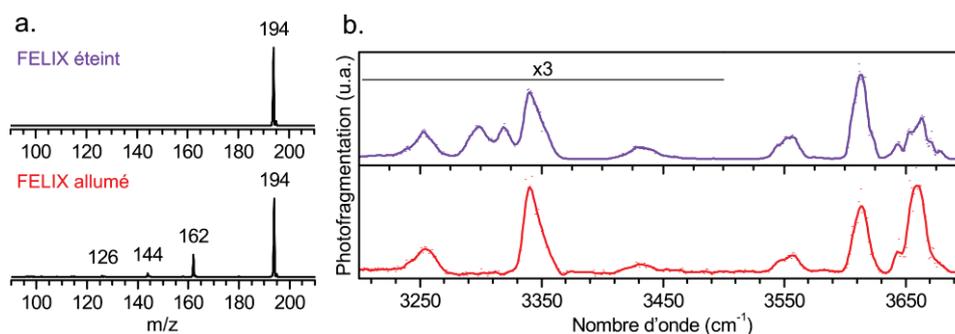


Figure 89 : spectre de masse (a) du mélange d' α et β méthyl glucosamine avec (rouge) ou sans (violet) irradiation laser à 893 cm^{-1} . Spectre IRMPD (b) entre 3200 et 3700 cm^{-1} du mélange d' α et β méthyl glucosamine (violet) et de ce mélange après extermination des espèces ayant une bande à 893 cm^{-1} (rouge)

3.4. Extermination d'une conformation à 1124 cm^{-1}

Enfin, la dernière zone d'intérêt dans la région $700\text{-}1800 \text{ cm}^{-1}$ est positionnée à 1124 cm^{-1} où l'anomère β méthylé absorbe peu en comparaison de ce qui est observé pour l'anomère α . Par comparaison avec la théorie cette bande est majoritairement attribuée à la conformation ${}^1\text{C}_4 \text{ OH}(3)$, toutefois la bande sélectionnée n'est spécifique d'aucune des trois formes observées en phase gazeuse ce qui rend ce dernier cas plus complexe.

Le spectre de photofragmentation obtenu par irradiation à 1124 cm^{-1} , figure 90, est constitué des trois fragments observés précédemment mais ceux-ci sont bien plus intenses, environ 50 % de l'ion parent a été fragmenté. Le spectre IRMPD du mélange d'anomères présenté sur la figure 90 est réalisé entre 3200 et 3700 cm^{-1} après irradiation préalable à 1124 cm^{-1} . Celui-ci est constitué de six bandes observées à 3255 , 3298 , 3320 , 3554 , 3613 et 3660 cm^{-1} et d'une activité autour de 3340 cm^{-1} . Ce spectre IRMPD est nettement différent du spectre du mélange d' α et β méthyl glucosamine et est caractérisé par une forte diminution de l'intensité des bandes de l'anomère α normalement observées à 3252 et 3341 cm^{-1} ainsi que par l'absence à 3432 cm^{-1} de la bande spécifique de la forme $\alpha \text{ } {}^1\text{C}_4 \text{ OH}(3)$.

Le spectre IRMPD après irradiation à 1124 cm^{-1} du mélange d' α et β méthyl glucosamine est donc composé des signatures infrarouges de l'anomère β méthylé ainsi que de la forme $\alpha \text{ } {}^4\text{C}_1 \text{ OH}(4)$. À 1124 cm^{-1} , la forme $\alpha \text{ } {}^1\text{C}_4 \text{ OH}(3)$ se photofragmente complètement et l'absence de bande à 3432 cm^{-1} indique qu'il n'y a pas de dynamique entre les conformations ${}^1\text{C}_4 \text{ OH}(3)$ et ${}^4\text{C}_1 \text{ OH}(4)$ de l'anomère α pendant le piégeage des ions. Ceci permet la réalisation du spectre IRMPD d'un mélange des formes ${}^4\text{C}_1$ des anomères α et β .

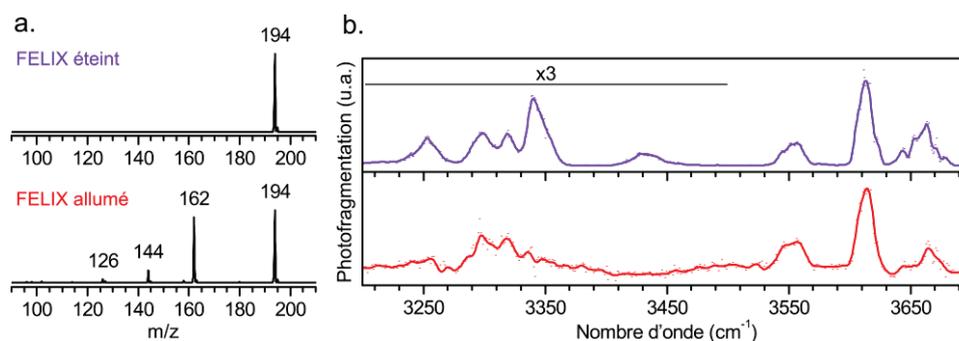


Figure 90 : spectre de masse (a) du mélange d' α et β méthyl glucosamine avec (rouge) ou sans (violet) irradiation laser à 1124 cm^{-1} . Spectre IRMPD (b) entre 3200 et 3700 cm^{-1} du mélange d' α et β méthyl glucosamine (violet) et de ce mélange après extermination des espèces ayant une bande à 1124 cm^{-1} (rouge)

3.5. Conclusion

La spectroscopie d'extermination utilisant deux lasers infrarouges est une méthode spectroscopique permettant la réalisation du spectre IRMPD d'une espèce à partir d'un mélange. Un premier laser va photofragmenter totalement l'une des formes présentes en phase gazeuse, tandis que le second réalise le spectre IRMPD de l'espèce restante. Cette méthode a permis la réalisation du spectre IRMPD de l'anomère α de la méthyl glucosamine à partir d'un mélange des deux anomères ou encore le spectre IRMPD de ce mélange sans l'une des conformations normalement observées, la forme $\alpha\text{ }^1\text{C}_4\text{ OH}(3)$. Ces résultats mettent en évidence l'absence de dynamique entre les conformations $^1\text{C}_4\text{ OH}(3)$ et $^4\text{C}_1\text{ OH}(4)$ de l'anomère α à l'intérieur du piège à ions.

L'utilisation de FELIX et d'un OPO de façon simultanée est donc possible, et permet la réalisation de spectres IRMPD d'espèces sélectionnées en conformation ou en isomère. En revanche l'utilisation de ces deux lasers en simultané nécessite des modifications instrumentales entraînant une perte de puissance laser. De plus, la gamme $700\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ uniquement accessible grâce à un laser à électrons libres ne contient pas forcément de bandes spécifiques à une conformation donnée et l'utilisation de l'OPO pour la photofragmentation est inadéquate dans ces conditions. Par contre, un dispositif de spectroscopie d'extermination utilisant deux lasers OPO peut être une perspective intéressante dans la configuration actuelle du dispositif expérimental. En effet, l'utilisation de la même gamme spectrale permet d'avoir une puissance suffisante pour photofragmenter avec le laser OPO et la gamme $2700\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ est pertinente pour différencier les différentes formes présentes en phase gazeuse d'un ose comme la glucosamine. D'un point de vue général, cette méthode est particulièrement adaptée aux petites molécules comme les monosaccharides puisqu'ils ont l'avantage de posséder des bandes spécifiques dans la région $2700\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ ce qui n'est pas toujours le cas pour des systèmes de plus grosse taille. En revanche, dans le cas d'oligosaccharides la région disponible à l'aide de lasers à électrons libres, $100\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$, reste à être explorée afin d'identifier des signatures isomère ou conformation spécifiques.

4. Couplage HPLC/MS/IR pour l'analyse en ligne

La séparation spectroscopique d'espèces a été démontrée sur la glucosamine où des bandes spécifiques des différentes formes présentes en phase gazeuse sont observées. Une autre solution pour séparer différents isomères consiste à utiliser une méthode séparative comme la chromatographie liquide en amont de l'étude spectroscopique. Un couplage HPLC/LTQ XL/OPO a été développé en collaboration avec l'équipe Méthodes séparatives de l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon, dans le but de combiner la séparation par chromatographie liquide et l'identification par spectroscopie infrarouge pour l'étude de mélanges de même masse.

4.1. Analyse d'un mélange de régio-isomères

Un mélange de deux régio-isomères a été réalisé afin de tester le potentiel du couplage HPLC/LTQ XL/OPO pour réaliser le spectre IRMPD d'espèces séparées de leurs isomères par chromatographie liquide. Les deux disaccharides sélectionnés sont représentés en figure 91 et composés de deux *N*-acétyl glucosamine et seule la position de la liaison diffère, elles sont liées soit par une liaison de type β 1,4 soit par une liaison de type β 1,6.

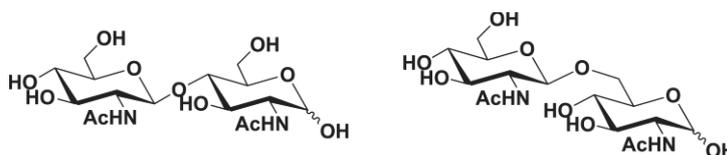


Figure 91 : GlcNAc β (1→4) GlcNAc (gauche) et GlcNAc β (1→6) GlcNAc (droite)

4.1.1. Séparation chromatographique de GlcNAc β (1→4) GlcNAc et de GlcNAc β (1→6) GlcNAc

La figure 92 représente le chromatogramme d'un mélange de GlcNAc β (1→4) GlcNAc et de GlcNAc β (1→6) GlcNAc ainsi que celui de standards purs de ces isomères dans les mêmes conditions expérimentales. Ces deux disaccharides ont été séparés à un débit de 400 μ L/min en utilisant une phase mobile contenant 91 % d'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique et 9 % d'eau avec 0,1 % d'acide formique. Sur le chromatogramme du mélange 5 pics différents sont observés : les trois premiers autour de 6 minutes sont comparables aux pics du standard de GlcNAc β (1→4) GlcNAc alors que les deux derniers correspondent parfaitement à ceux observés à 8,4 et 10,0 minutes sur le chromatogramme du disaccharide de liaison β 1,6. Il est à noter qu'un pic de faible intensité est observé pour ce standard à 6,6 minutes et correspond à l'un des pics du disaccharide de liaison β 1,4.

Les deux régio-isomères sont parfaitement séparés grâce à la méthode chromatographique mise au point et deux zones distantes d'une minute spécifiques de chacun des isomères sont définies sur le chromatogramme du mélange afin de réaliser la spectroscopie infrarouge. La zone A, entre 5,3 et 7,0

minutes, correspond au standard du disaccharide de liaison β 1,4 et la zone B, entre 8,0 et 10,3 minutes, permet d'identifier celui de liaison β 1,6. Toutefois, cette identification n'est possible que par comparaison avec des standards.

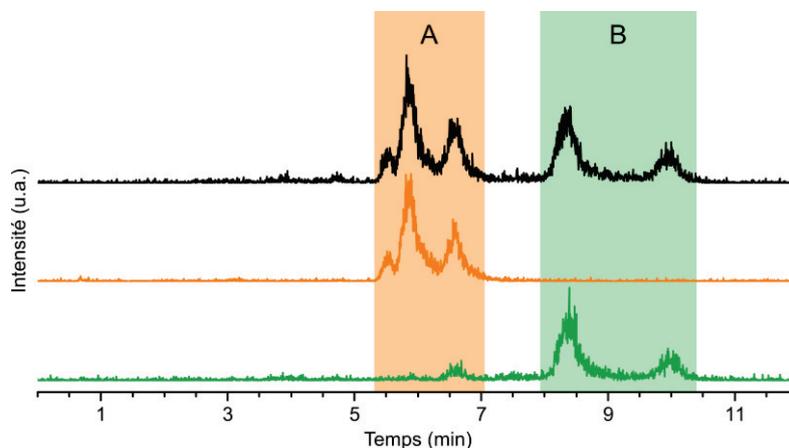


Figure 92 : Chromatogramme d'un mélange de GlcNAc β (1 \rightarrow 4) GlcNAc et de GlcNAc β (1 \rightarrow 6) GlcNAc (noir), et de standards de GlcNAc β (1 \rightarrow 4) GlcNAc (orange) et de GlcNAc β (1 \rightarrow 6) GlcNAc (vert). La phase mobile est constituée de 91 % d'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique et 9 % d'eau avec 0,1 % d'acide formique permettant de séparer ces isomères à un débit de 400 μ L/min

4.1.2. Analyse en ligne du mélange

4.1.2.1. Spectre de fragmentation

Pour s'affranchir de l'utilisation de standards pour l'identification des différents pics chromatographiques, une solution serait d'analyser la masse de chacun des composés grâce au couplage HPLC/MS. Malheureusement, dans le cas d'un mélange de régio-isomères, celle-ci n'est d'aucune utilité. La fragmentation des disaccharides peut potentiellement donner des informations sur la position de la liaison, les spectres de fragmentation dans la zone A et dans la zone B sont représentés sur la figure 93. Le disaccharide parent de $m/z = 425$ se fragmente en perdant une molécule d'eau donnant un ion de $m/z = 407$. De plus, il y a également rupture de la liaison glycosidique donnant ainsi les fragments B, C, Y ou Y/B correspondant à une *N*-acétyl hexosamine ($m/z = 222$) et à son équivalent déshydraté ($m/z = 204$). Une *N*-acétyl hexosamine doublement déshydratée est également observée à $m/z = 186$.

Dans ce cas, le couplage HPLC/MS ne permet pas de différencier les deux régio-isomères, ce qui montre l'intérêt d'obtenir une information supplémentaire pour les identifier comme leur signature infrarouge.

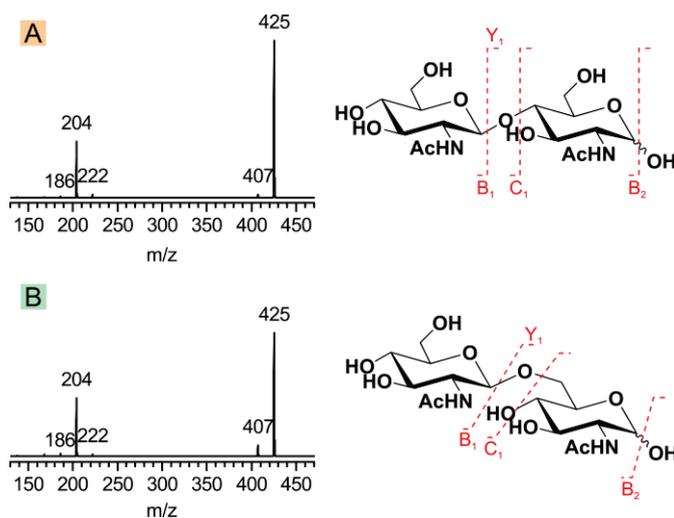


Figure 93 : Spectres de fragmentation du mélange de GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc et de GlcNAc $\beta(1\rightarrow6)$ dans la zone A (haut) et dans la zone B (bas).

4.1.2.2. Spectres IRMPD

Dans les conditions actuelles, un spectre IRMPD entre 2700 et 3700 cm^{-1} est réalisé en 6,7 minutes. Or les pics chromatographiques durent environ deux minutes. Il est donc nécessaire de diminuer le débit dans les zones A et B et en passant le débit à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, il est possible d'effectuer un spectre IRMPD complet entre 2700 et 3700 cm^{-1} . Les spectres IRMPD obtenus dans la zone A et dans la zone B sont représentés sur la figure 94 et comparés aux spectres IRMPD de référence des disaccharides de *N*-acétyl glucosamine de liaison $\beta 1,4$ et $\beta 1,6$.

Les spectres IRMPD des zones A et B possèdent des bandes aux mêmes positions, mais la signature infrarouge globale est nettement différente. Le spectre IRMPD dans la zone A est identique à celui de la référence du disaccharide de liaison $\beta 1,4$ et celui obtenu dans la zone B est semblable à la référence du disaccharide de liaison $\beta 1,6$. Alors que les spectres se superposent parfaitement avec leur référence au-dessus de 3300 cm^{-1} , l'intensité observée en dessous de 3300 cm^{-1} est légèrement plus faible mais le motif reste conservé.

À partir des spectres IRMPD ainsi réalisés, le pic chromatographique de la zone A est identifié comme correspondant à un GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc et celui de la zone B comme étant attribué à un GlcNAc $\beta(1\rightarrow6)$ GlcNAc. Le couplage HPLC/LTQ XL/OPO permet donc d'identifier les différentes espèces présentes dans un mélange grâce à une séparation chromatographique puis à une analyse des différents pics par spectroscopie infrarouge en phase gazeuse. Cette méthode repose sur la comparaison des spectres IRMPD avec une base de données de spectres de référence. Elle permet de s'affranchir de l'utilisation d'étalons nécessaires en HPLC pour identifier les différents pics.

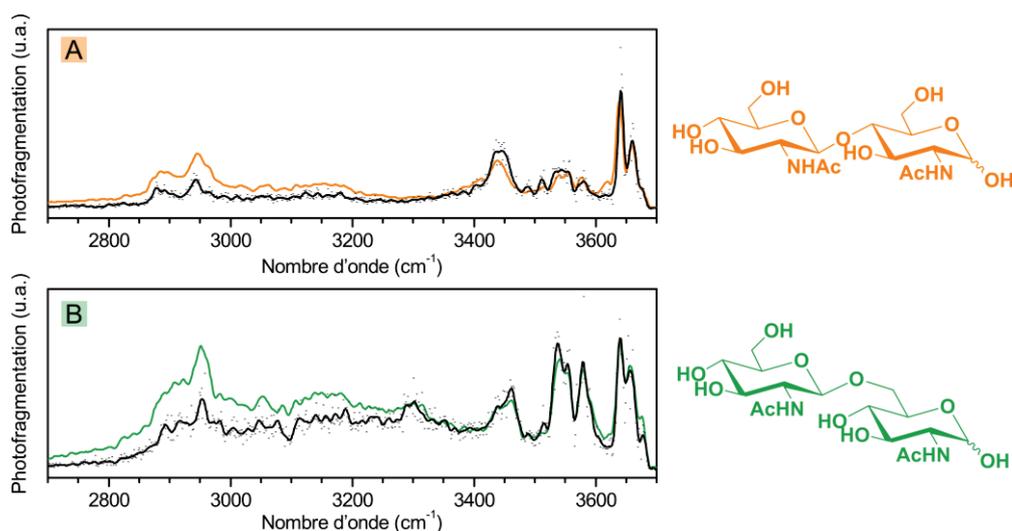


Figure 94 : Spectres IRMPD du mélange de GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc et de GlcNAc $\beta(1\rightarrow6)$ dans la zone A (haut) et dans la zone B (bas). Le spectre IRMPD du mélange dans chacune des zones est comparé au spectre IRMPD de référence de GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc (orange) et de GlcNAc $\beta(1\rightarrow6)$ GlcNAc (vert)

4.1.3. Avantages par rapport à une analyse MS/IR seule

Comme discuté précédemment, les spectres IRMPD des deux références ne possèdent pas de bandes d'absorption spécifiques de l'une ou l'autre des deux formes. La figure 95 représente les spectres IRMPD de chacune des deux références, ainsi que celui d'un mélange de celles-ci, et ces trois spectres possèdent des signatures infrarouges globales différentes. Il est donc possible de différencier ces trois échantillons mais il est impossible d'identifier la composition du mélange puisque aucune bande spécifique n'est observable.

En revanche, l'utilisation du couplage HPLC/LTQ XL/OPO permet de séparer les différentes espèces en amont et de réaliser leur spectre IRMPD individuel afin de les identifier. Cet exemple montre la nécessité d'utiliser des méthodes séparatives en amont de la réalisation de spectres IRMPD pour l'analyse d'échantillons complexes.

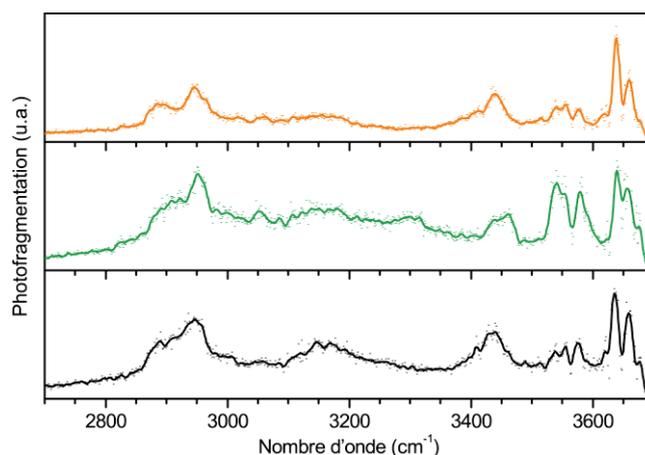


Figure 95 : Spectres IRMPD de de GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc (orange), GlcNAc $\beta(1\rightarrow6)$ GlcNAc (vert) et d'un mélange de ces deux isomères (noir)

4.2. Analyse d'un mélange de stéréo-isomères

Des disaccharides composés d'un galactose et d'une *N*-acétyl glucosamine reliés soit par une liaison $\alpha(1,4)$ soit par une liaison $\beta(1,4)$ sont représentés sur la figure 96. Ceux-ci ont été mélangés afin de tester les performances du couplage HPLC/LTQ XL/OPO lorsque les conditions chromatographiques ne sont pas optimales et que les deux composés ne sont pas totalement séparés.

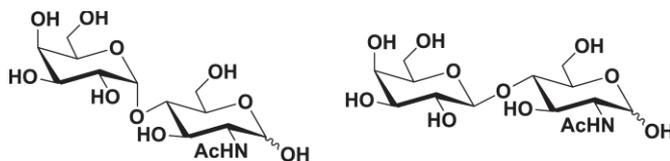


Figure 96 : Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc (gauche) et Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc (droite)

4.2.1. Séparation chromatographique de Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc et de Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc

Dans des conditions similaires à celles utilisées pour séparer les deux régio-isomères, c'est-à-dire en utilisant la même colonne chromatographique et une phase mobile contenant 95 % d'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique et 5 % d'eau avec 0,1 % d'acide formique, il est possible de séparer partiellement ces deux espèces. Le débit est de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ jusque 12 minutes, puis il est diminué à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ afin d'avoir suffisamment de temps pour réaliser le spectre IRMPD de chacune des espèces. La figure 97 représente le chromatogramme du mélange des deux stéréo-isomères ainsi que ceux de standards purifiés de *N*-acétyl lactosamine et de son isomère de configuration α .

Le disaccharide de configuration α représenté en rouge sur la figure est élué de la colonne à partir de 14 minutes et jusqu'à 37 minutes mais la plupart du signal est observé avant 25 minutes. De son côté la *N*-acétyl lactosamine est élue à partir de la 21^{ème} minute et jusqu'à 37 minutes. Deux zones sont ainsi identifiées comme d'intérêt pour réaliser la spectroscopie infrarouge en phase gazeuse, la zone A entre 14,4 et 21,1 minutes où seulement le disaccharide de configuration α est présent et la zone B

entre 24,6 et 31,3 minutes où la *N*-acétyl lactosamine est majoritairement observée d'après les chromatogrammes des standards.

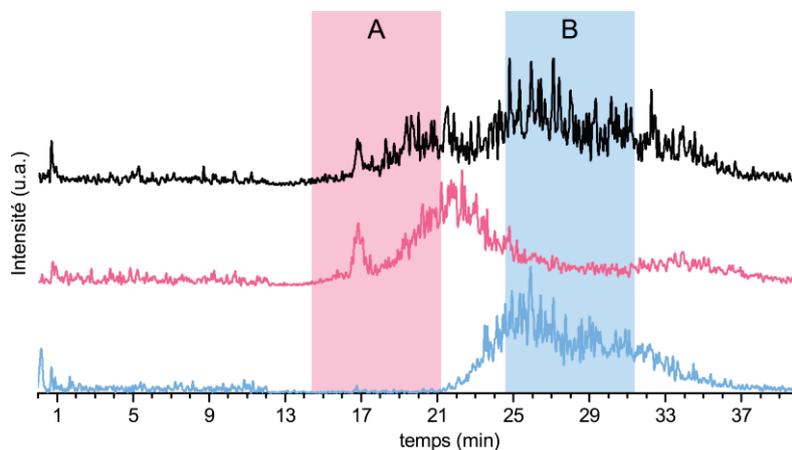


Figure 97 : Chromatogramme d'un mélange de Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc et de Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc (noir) et de standards de Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc (rouge) et de Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc (bleu)

4.2.2. Analyse en ligne du mélange

4.2.2.1. Spectres de fragmentation

Les spectres de fragmentation dans la zone A et dans la zone B sont représentés sur la figure 98. Ces deux spectres sont similaires et comportent un ion parent de $m/z = 384$ correspondant bien à un disaccharide constitué d'un hexose et d'une *N*-acétyl hexosamine. Différents fragments sont observés, le fragment de type B_2 à $m/z = 366$, le fragment Y_1 de $m/z = 222$ et le fragment Y_1/B_2 de $m/z = 204$. Un ion de très faible intensité est également observé à $m/z = 168$ et correspond à une *N*-acétyl hexosamine triplement déshydratée.

Encore une fois, la fragmentation des disaccharides ne permet pas de les distinguer, il est nécessaire d'utiliser la spectroscopie infrarouge qui est suffisamment sensible pour identifier ces deux disaccharides qui ne diffèrent que par la configuration de leur liaison glycosidique.

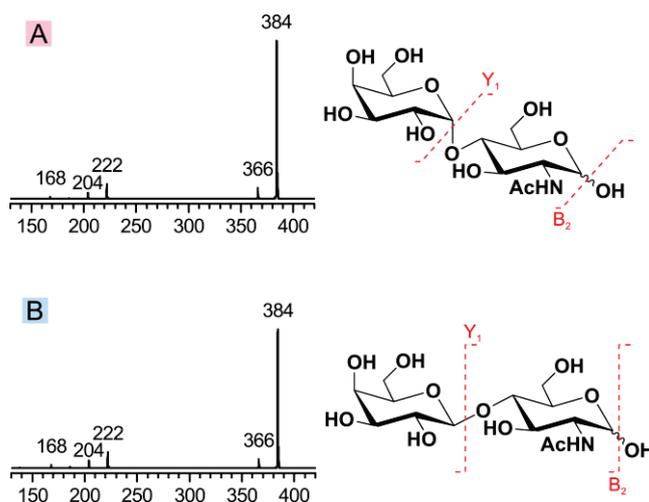


Figure 98 : Spectres de fragmentation du mélange de Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc et de Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc dans la zone A (haut) et dans la zone B (bas)

4.2.2.2. Spectres IRMPD

Les spectres IRMPD obtenus dans la zone A et dans la zone B sont représentés sur la figure 99 et comparés aux spectres IRMPD de la *N*-acétyl lactosamine et de son isomère de configuration α .

Les spectres IRMPD des zones A et B possèdent une signature infrarouge globale différente, de plus au-dessus de 3300 cm^{-1} , le spectre IRMPD de la zone A est constitué de cinq bandes intenses à 3375 , 3529 , 3576 , 3636 et 3662 cm^{-1} alors que celui réalisé dans la zone B est composé d'uniquement trois bandes intenses à 3403 , 3635 et 3661 cm^{-1} . Ces deux spectres sont nettement différents et par comparaison avec les spectres IRMPD des références, il est possible d'identifier le composé élué dans la zone A comme étant une *N*-acétyl lactosamine alors que celui élué dans la zone B est identifié comme du 2-acetamido-2-deoxy-4-O- α -D-galactopyranosyl-D-glucopyranose.

Comme pour les spectres IRMPD des régio-isomères, l'intensité de fragmentation dans la région 2700 - 3300 cm^{-1} est plus faible lors de la réalisation des spectres infrarouges lorsqu'une séparation chromatographique est réalisée en amont. Celle-ci est toutefois nécessaire puisque uniquement des bandes spécifiques sont observées pour le disaccharide de configuration α alors que celui de configuration β n'en possède pas. De plus un léger décalage en nombre d'onde est observé lors de la comparaison entre le spectre IRMPD dans la zone A et celui de sa référence correspondante ; il est attribué à un défaut de calibration en longueur d'onde.

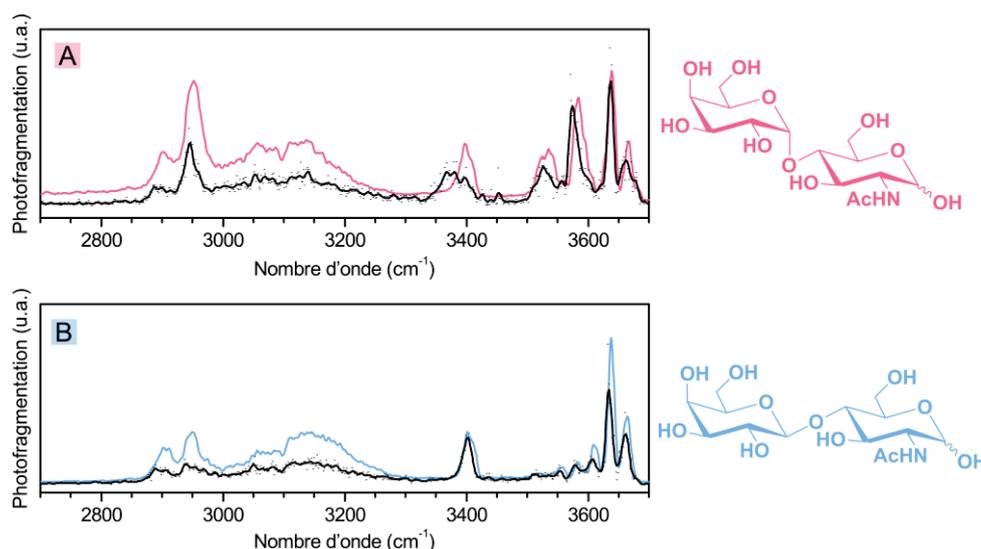


Figure 99 : Spectres IRMPD du mélange de Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc et de Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc dans la zone A (haut) et dans la zone B (bas). Le spectre IRMPD du mélange dans chacune des zones est comparé au spectre IRMPD de référence de Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc (rouge) et de Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc (bleu)

4.3. Séparation des anomères

La séparation des anomères en chromatographie et notamment en mode HILIC est décrite dans différentes publications sans pour autant avoir été démontrée[35,36] et celle-ci semble être facilitée lorsque la phase mobile est acidifiée.[37] En effet, les chromatogrammes précédents étaient constitués d'au moins deux pics pour chacune des espèces. Le couplage HPLC/MS/IR est un outil permettant d'analyser en ligne les deux pics et est capable de différencier les anomères grâce à leur spectre IRMPD. La glucosamine, représentée sous ses deux formes anomériques et sous sa forme linéaire en figure 100, est un exemple parfait puisque les différentes bandes expérimentales ont été attribuées précédemment et certaines sont spécifiques de l'anomère α ou β . Toutefois, pour pouvoir vérifier qu'il est possible de séparer des anomères par chromatographie, il faut que la dynamique de mutarotation soit plus lente que le temps d'analyse.

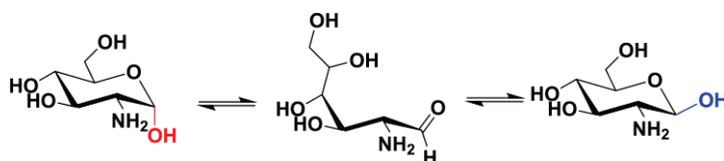


Figure 100 : La glucosamine sous sa forme α (gauche), sous sa forme linéaire (milieu) et sous sa forme β (droite)

4.3.1. Séparation chromatographique de la glucosamine

Tout d'abord, une solution de glucosamine a été séparée par chromatographie liquide dans des conditions similaires à celles utilisées pour les disaccharides et le chromatogramme obtenu est représenté sur la figure 101. La même colonne a été utilisée, et avec un débit de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ et une composition en phase mobile de 90 % d'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique et 10 % d'eau avec

0,1 % d'acide formique, le chromatogramme réalisé est constitué de deux pics partiellement résolus observés à 12 minutes et à 14 minutes.

Lors d'une séparation chromatographique, la glucosamine est bien séparée en deux pics ayant des temps de rétention très proches. Dans ces conditions, le temps entre les deux pics est insuffisant pour réaliser le spectre IRMPD de chacun d'eux, il est donc nécessaire de diminuer le débit à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ à partir de 11 minutes.

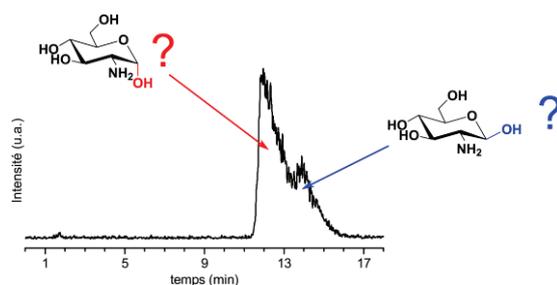


Figure 101 : Chromatogramme de la glucosamine

4.3.2. Analyse en ligne de la glucosamine par HPLC/MS/IR

4.3.2.1. Séparation de la glucosamine à bas débit

Le chromatogramme de la glucosamine avec une diminution du débit à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ à partir de 11,4 minutes est représenté sur la figure 102. Celui-ci est toujours constitué de deux motifs distincts, à savoir un pic intense autour de 15 minutes puis une longue trainée d'intensité sensiblement égale entre 19 et 27 minutes. Deux zones distinctes ont été sélectionnées afin d'identifier la présence ou non d'un seul des anomères, la zone 1 entre 12 et 18,7 minutes et la zone 2 entre 20 et 26,7 minutes.

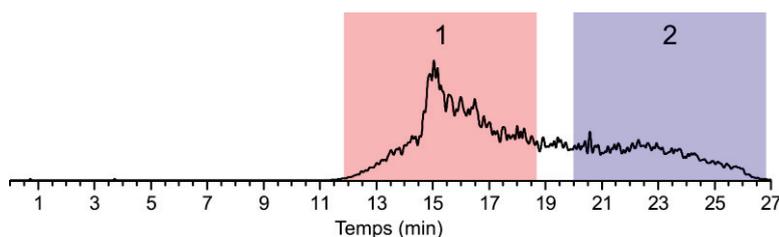


Figure 102 : Chromatogramme de la séparation de la glucosamine avec une diminution du débit à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ à partir de 11,4 minutes

4.3.2.2. Spectres de fragmentation

Sans surprise, les spectres de fragmentation dans la zone 1 et la zone 2 représentés en figure 103 sont similaires. Ceux-ci sont constitués de l'ion parent, la glucosamine protonée à $m/z = 180$ et de trois fragments correspondant à des déshydratations successives et observés à $m/z = 162$, 144 et 126.

Il n'est pas possible par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse d'obtenir suffisamment d'information structurale par fragmentation afin de mettre en évidence la présence d'un seul des anomères.

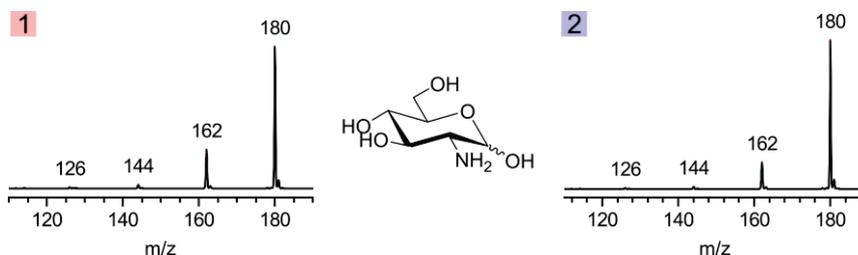


Figure 103 : Spectres de fragmentation de la glucosamine dans la zone 1 (gauche) et dans la zone 2 (droite)

4.3.2.3. Spectres IRMPD

Les spectres IRMPD de la glucosamine réalisés dans les zones 1 et 2 durant la séparation chromatographique sont représentés sur la figure 104 et ceux-ci sont différents entre eux, mais également différents du spectre IRMPD de la glucosamine décrit précédemment et constitué de trois formes différentes : α ¹C₄ OH(3), α ⁴C₁ OH(4), β ⁴C₁ OH(4). Le spectre de la zone 1 est constitué de deux bandes dans la région C-H à 2910 et 2950 cm⁻¹, et de cinq bandes dans la région des N-H avec deux bandes étalées à 3058 cm⁻¹ et 3168 cm⁻¹, deux bandes faiblement résolues à 3224 et 3258 cm⁻¹ ainsi qu'une bande intense à 3341 cm⁻¹. Enfin la région des O-H est constituée de deux bandes liées à 3428 et 3550 cm⁻¹ ainsi qu'un massif complexe de O-H libres avec un maximum d'intensité à 3638 cm⁻¹ et trois épaulements à 3611, 3659 et 3675 cm⁻¹.

Le spectre dans la zone 2 est également constitué dans la région C-H de deux bandes observées à 2901 et 2955 cm⁻¹, par contre, le motif observé dans la région des N-H est plus complexe. En effet, celui-ci est constitué de deux bandes liées à 3055 et 3168 cm⁻¹, d'une bande à 3238 cm⁻¹ et de deux bandes très rapprochées à 3301 et 3319 cm⁻¹. De plus un épaulement est observé à 3346 cm⁻¹. Enfin dans la région des O-H, les deux bandes liées sont observées à 3428 et 3550 cm⁻¹, mais le rapport d'intensité entre les deux a fortement changé, la première étant peu intense contrairement à la seconde. Enfin le motif des O-H libres est composé de trois bandes partiellement résolues à 3611, 3637 et 3667 cm⁻¹.

Par comparaison avec les références de l' α méthyl glucosamine et de la β méthyl glucosamine ainsi qu'avec les spectres infrarouges théoriques attribués, le spectre IRMPD dans la zone 1 est identifié comme contenant la forme α ¹C₄ OH(3) caractérisée par la bande O-H liée à 3428 cm⁻¹, ainsi que la forme α ⁴C₁ OH(4) composée d'une bande à 3550 cm⁻¹ et d'un motif N-H constitué de bandes à 3258 et 3341 cm⁻¹. C'est-à-dire que le spectre dans la zone 1 est identifié comme étant le spectre IRMPD de l'anomère α de la glucosamine. De son côté, le spectre réalisé dans la zone 2 contient les bandes caractéristiques de la forme β ⁴C₁ OH(4) identifiée grâce à la présence du doublet de bandes N-H à

3301 et 3319 cm^{-1} et de la bande O-H à 3550 cm^{-1} . Par contre ce spectre IRMPD n'est pas composé exclusivement des bandes caractéristiques de l'anomère β , en effet, ce spectre possède de petites contributions de l'anomère α , notamment la bande O-H liée à 3428 cm^{-1} , l'épaule à 3346 cm^{-1} , et la bande N-H liée à 3055 cm^{-1} . Il est néanmoins différent du spectre habituel de la glucosamine, ce qui suggère que le ratio α/β est fortement modifié avec une large prédominance de la forme β .

Par chromatographie liquide, deux pics sont obtenus lors de la séparation de la glucosamine et le couplage avec la spectroscopie infrarouge intégrée à la spectrométrie de masse a permis de les identifier comme étant les anomères α et β de la glucosamine. Toutefois, alors qu'il a été possible d'obtenir un spectre IRMPD de l' α -glucosamine pure à partir du premier pic, les conditions chromatographiques n'étaient pas suffisantes pour séparer convenablement le second pic du premier afin d'obtenir le spectre IRMPD de la β -glucosamine pure et des contributions des formes α sont également observées. Ces résultats démontrent que la dynamique de mutarotation est plus lente que le temps de transfert de la colonne chromatographique à l'analyse spectroscopique au sein du spectromètre de masse (inférieur à une seconde). Il est donc possible en couplant une méthode séparative de type HPLC avec la méthode MS/IR de réaliser les spectres des deux anomères α et β à condition de les séparer suffisamment.

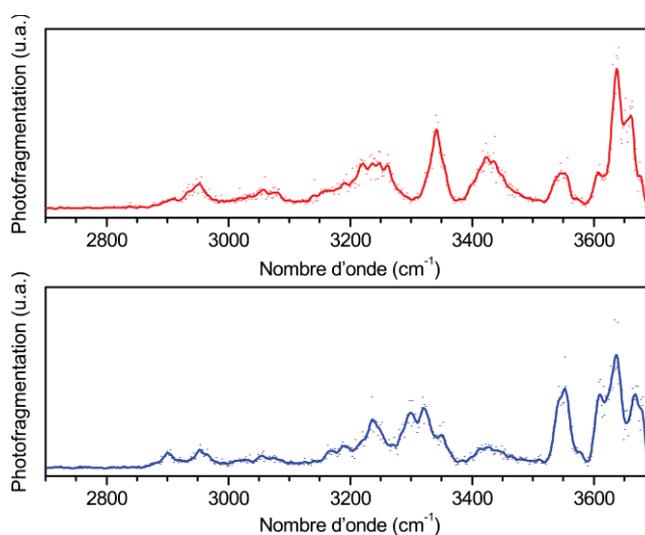


Figure 104 : Spectres IRMPD de la glucosamine dans la zone 1 (rouge) et dans la zone 2 (bleu)

4.4. Conclusion et perspectives

Le spectre IRMPD permet d'obtenir une information détaillée de la structure isolée à l'intérieur du piège à ions, toutefois cette signature peut devenir complexe, difficile à interpréter ou le spectre peut même être congestionné. Ceci peut être causé soit par la présence dans la solution à étudier de plusieurs isomères, soit par la présence de plusieurs conformations en phase gazeuse.

Afin de simplifier les spectres IRMPD lorsqu'un mélange est présent au sein du piège d'ions, une des méthodes possibles consiste à séparer le mélange en amont de l'isolation dans le piège d'ions grâce à une méthode séparative telle que la chromatographie liquide. Ceci nécessite de rendre compatible la durée d'élution d'un pic chromatographique qui est court, avec une analyse structurale par spectroscopie IRMPD qui est généralement longue. Le couplage HPLC/LTQ XL/OPO a démontré la possibilité d'effectuer le spectre IRMPD d'une espèce individuelle à partir d'un mélange de deux isomères en conservant suffisamment de résolution chromatographique et spectroscopique. Enfin grâce à ce couplage, il est possible d'obtenir distinctement les spectres IRMPD des anomères α et β .

Cette méthode ouvre la voie de l'utilisation du couplage de la spectroscopie infrarouge et de spectrométrie de masse pour l'analyse d'échantillons plus complexes ou afin d'obtenir des spectres IRMPD d'espèces sélectionnées en anomères. La possibilité de coupler la méthode MS/IR avec la chromatographie liquide rend cette méthode d'identification structurale compatible avec l'analyse d'échantillons d'isomères d'oligosaccharides ou d'un point de vue plus général vers son utilisation pour identifier des composés lorsque la masse ou la fragmentation ne permet pas de les reconnaître. Pour que cette méthode se développe pleinement, il est encore toutefois nécessaire de diminuer le temps nécessaire pour réaliser un spectre IRMPD qui est encore de 6,7 minutes pour 1000 cm^{-1} , afin de le rendre compatible avec des conditions chromatographiques performantes.

5. Bibliographie

1. Li, D. .; Sheen, J. .; Her, G. . Structural analysis of chromophore-labeled disaccharides by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry using ion trap mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 292–300.
2. Mechref, Y.; Novotny, M. V. Glycomic analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 207–222.
3. Mittermayr, S.; Bones, J.; Guttman, A. Unraveling the Glyco-Puzzle: Glycan Structure Identification by Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4228–4238.
4. Carlsson, N. G.; Karlsson, H.; Sandberg, A. S. Determination of oligosaccharides in foods, diets, and intestinal contents by high-temperature gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2404–2412.
5. Cointe, D.; Leroy, Y.; Chirat, F. Determination of the sialylation level and of the ratio α -(2→3)/ α -(2→6) sialyl linkages of N-glycans by methylation and GC/MS analysis. *Carbohydr. Res.* **1998**, *311*, 51–59.
6. Medeiros, P. M.; Simoneit, B. R. T. Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1141*, 271–278.
7. Melmer, M.; Stangler, T.; Schiefermeier, M.; Brunner, W.; Toll, H.; Rupprechter, A.; Lindner, W.; Premstaller, A. HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 905–914.
8. Yamaguchi, Y.; Nishima, W.; Re, S.; Sugita, Y. Confident identification of isomeric N-glycan structures by combined ion mobility mass spectrometry and hydrophilic interaction liquid chromatography: Identification of isomeric N-glycans by IM-MS and HILIC. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26*, 2877–2884.
9. Leijdekkers, A. G. M.; Huang, J.-H.; Bakx, E. J.; Gruppen, H.; Schols, H. A. Identification of novel isomeric pectic oligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography coupled to traveling-wave ion mobility mass spectrometry. *Carbohydr. Res.* **2015**, *404*, 1–8.
10. Bruggink, C.; Maurer, R.; Herrmann, H.; Cavalli, S.; Hoefler, F. Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1085*, 104–109.
11. Inoue, K.; Kitahara, K.; Aikawa, Y.; Arai, S.; Masuda-Hanada, T. HPLC Separation of All Aldopentoses and Aldohexoses on an Anion-Exchange Stationary Phase Prepared from Polystyrene-Based Copolymer and Diamine: The Effect of NaOH Eluent Concentration. *Molecules* **2011**, *16*, 5905–5915.
12. Zhang, Z.; Khan, N. M.; Nunez, K. M.; Chess, E. K.; Szabo, C. M. Complete Monosaccharide Analysis by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4104–4110.
13. Saba, J. A.; Shen, X.; Jamieson, J. C.; Perreault, H. Effect of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone labeling on the fragmentation behavior of asialo and sialylated N-linked glycans under electrospray ionization conditions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 704–711.
14. Higel, F.; Demelbauer, U.; Seidl, A.; Friess, W.; Sörgel, F. Reversed-phase liquid-chromatographic mass spectrometric N-glycan analysis of biopharmaceuticals. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 2481–2493.
15. Ruiz-Matute, A. I.; Hernández-Hernández, O.; Rodríguez-Sánchez, S.; Sanz, M. L.; Martínez-Castro, I. Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1226–1240.
16. Harvey, D. J. Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1196–1225.
17. Gabryelski, W.; Froese, K. L. Rapid and sensitive differentiation of anomers, linkage, and position isomers of disaccharides using High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry (FAIMS). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 265–277.
18. Levin, D. S.; Vouros, P.; Miller, R. A.; Nazarov, E. G. Using a nanoelectrospray-differential mobility spectrometer-mass spectrometer system for the analysis of oligosaccharides with solvent selected control over ESI aggregate ion formation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 502–511.

19. Winkler, W.; Huber, W.; Vlasak, R.; Allmaier, G. Positive and negative electrospray ionisation travelling wave ion mobility mass spectrometry and low-energy collision-induced dissociation of sialic acid derivatives: ESI travelling wave IM-MS and low-energy CID of sialic acid derivatives. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 3235–3244.
20. Fasciotti, M.; Sanvido, G. B.; Santos, V. G.; Lalli, P. M.; McCullagh, M.; de Sá, G. F.; Daroda, R. J.; Peter, M. G.; Eberlin, M. N. Separation of isomeric disaccharides by traveling wave ion mobility mass spectrometry using CO₂ as drift gas: Increasing ion mobility Synapt resolution with CO₂. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 1643–1647.
21. Harvey, D. J.; Scarff, C. A.; Edgeworth, M.; Crispin, M.; Scanlan, C. N.; Sobott, F.; Allman, S.; Baruah, K.; Pritchard, L.; Scrivens, J. H. Travelling wave ion mobility and negative ion fragmentation for the structural determination of N-linked glycans: General. *ELECTROPHORESIS* **2013**, *34*, 2368–2378.
22. Liu, Y.; Clemmer, D. E. Characterizing Oligosaccharides Using Injected-Ion Mobility/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2504–2509.
23. Williams, J. P.; Grabenauer, M.; Holland, R. J.; Carpenter, C. J.; Wormald, M. R.; Giles, K.; Harvey, D. J.; Bateman, R. H.; Scrivens, J. H.; Bowers, M. T. Characterization of simple isomeric oligosaccharides and the rapid separation of glycan mixtures by ion mobility mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2010**, *298*, 119–127.
24. Zhu, F.; Lee, S.; Valentine, S. J.; Reilly, J. P.; Clemmer, D. E. Mannose7 Glycan Isomer Characterization by IMS-MS/MS Analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 2158–2166.
25. Nagornova, N. S.; Rizzo, T. R.; Boyarkin, O. V. Exploring the Mechanism of IR-UV Double-Resonance for Quantitative Spectroscopy of Protonated Polypeptides and Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6002–6005.
26. Dean, J. C.; Burke, N. L.; Hopkins, J. R.; Redwine, J. G.; Ramachandran, P. V.; McLuckey, S. A.; Zwier, T. S. UV Photofragmentation and IR Spectroscopy of Cold, G-Type β-O-4 and β-β Dilignol-Alkali Metal Complexes: Structure and Linkage-Dependent Photofragmentation. *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 1917–1932.
27. Redwine, J. G.; Davis, Z. A.; Burke, N. L.; Oglesbee, R. A.; McLuckey, S. A.; Zwier, T. S. A novel ion trap based tandem mass spectrometer for the spectroscopic study of cold gas phase polyatomic ions. *Int. J. Mass Spectrom.* **2013**, *348*, 9–14.
28. Burke, N. L.; Redwine, J. G.; Dean, J. C.; McLuckey, S. A.; Zwier, T. S. UV and IR spectroscopy of cold protonated leucine enkephalin. *Int. J. Mass Spectrom.* **2015**, *378*, 196–205.
29. Leavitt, C. M.; Wolk, A. B.; Kamrath, M. Z.; Garand, E.; Van Stipdonk, M. J.; Johnson, M. A. Characterizing the Intramolecular H-bond and Secondary Structure in Methylated GlyGlyH⁺ with H₂ Predissociation Spectroscopy. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22*, 1941–1952.
30. Stedwell, C. N.; Galindo, J. F.; Roitberg, A. E.; Polfer, N. C. Structures of Biomolecular Ions in the Gas Phase Probed by Infrared Light Sources. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2013**, *6*, 267–285.
31. Fournier, J. A.; Wolk, A. B.; Johnson, M. A. Integration of Cryogenic Ion Vibrational Predissociation Spectroscopy with a Mass Spectrometric Interface to an Electrochemical Cell. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 7339–7344.
32. Leavitt, C. M.; Wolk, A. B.; Fournier, J. A.; Kamrath, M. Z.; Garand, E.; Van Stipdonk, M. J.; Johnson, M. A. Isomer-Specific IR-IR Double Resonance Spectroscopy of D₂-Tagged Protonated Dipeptides Prepared in a Cryogenic Ion Trap. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 1099–1105.
33. Jašík, J.; Gerlich, D.; Roithová, J. Two-Color Infrared Predissociation Spectroscopy of C₆H₆²⁺ Isomers Using Helium Tagging. *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 2532–2542.
34. Compagnon, I.; Oomens, J.; Bakker, J.; Meijer, G.; von Helden, G. Vibrational spectroscopy of a non-aromatic amino acid-based model peptide: identification of the γ-turn motif of the peptide backbone. *Phys Chem Chem Phys* **2005**, *7*, 13–15.
35. Bendiak, B.; Orr, J.; Brockhausen, I.; Vella, G.; Phoebe, C. Separation of neutral reducing oligosaccharides derived from glycoproteins by HPLC on a hydroxylated polymeric support. *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 96–105.

36. Alpert, A. J.; Shukla, M.; Shukla, A. K.; Zieske, L. R.; Yuen, S. W.; Ferguson, M. A. J.; Mehlert, A.; Pauly, M.; Orlando, R. Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates. *J. Chromatogr. A* **1994**, *676*, 191–202.
37. Ng Ying Kin, N. M. K.; Wolfe, L. S. High-performance liquid chromatographic analysis of oligosaccharides and glycopeptides accumulating in lysosomal storage disorders. *Anal. Biochem.* **1980**, *102*, 213–219.

Conclusion

L'étude et la compréhension des structures des carbohydrates est nécessaire afin d'être capable de mieux comprendre le vivant. L'analyse du glycome est en pleine expansion mais certains verrous sont encore présents et freinent la recherche. La production à grande échelle d'oligosaccharides représentatifs que ce soit par synthèse chimique ou enzymatique et le développement d'une méthode permettant le séquençage des oligosaccharides sont les deux points majeurs à développer pour accélérer l'analyse du glycome. Ces travaux de thèse sont consacrés à la mise au point d'une technique analytique permettant de caractériser la structure d'oligosaccharides par leur séquençage.

Le couplage de la spectroscopie infrarouge et de la spectrométrie de masse permet d'enregistrer le spectre vibrationnel d'une espèce en même temps que son spectre de masse et le dispositif expérimental réalisé durant cette thèse possède des caractéristiques uniques lui permettant d'obtenir un spectre IRMPD de façon rapide et robuste et ce, indépendamment de l'état de charge utilisé pour ioniser l'espèce : protoné, déprotoné, adduit chargé. Alors que l'information de la masse est insuffisante pour différencier les carbohydrates où de nombreuses isoméries sont présentes, le spectre infrarouge, lui, dépend de la nature de l'isomère et des liaisons hydrogènes intramoléculaires formées en phase gazeuse.

Grâce à cette méthode, les principaux hexoses ont été identifiés grâce à leur signature vibrationnelle unique, et il est même possible par comparaison avec des spectres infrarouges théoriques obtenus après une recherche conformationnelle d'identifier la conformation adoptée par la molécule en phase gazeuse. En effet, le spectre IRMPD est sensible aux différentes formes de chaises ou de bateaux qu'adopte le pyranose. Cette métrique, orthogonale à la masse reste pertinente pour l'étude de plus

gros systèmes comme les disaccharides. Le spectre IRMPD dépend de la configuration et de la position de la liaison glycosidique, de la nature des constituants du disaccharide, ainsi que de leur séquence. En plus de cela, il est également possible d'identifier la position d'une modification fonctionnelle comme un sulfate sur un monosaccharide ou un disaccharide. Par contre, le spectre infrarouge perd en résolution sur des tétrasaccharides c'est pourquoi il est nécessaire de combiner la spectroscopie infrarouge en phase gazeuse avec les méthodes de fragmentation développées en spectrométrie de masse afin de séquencer les oligosaccharides.

Pour cela, en se basant sur la nomenclature de Domon & Costello, la signature infrarouge de chacun des fragments obtenus a été comparée avec les spectres IRMPD des références correspondantes. La nature des monosaccharides est conservée pour chacune des fragmentations et la stéréochimie de la liaison glycosidique peut être obtenue sur les fragments complets de monosaccharides. Le découpage de l'oligosaccharide en disaccharide est également possible et permet ainsi d'obtenir une information sur la position de la liaison glycosidique. Tous ces éléments permettent donc d'utiliser le couplage de la spectroscopie infrarouge et de la spectrométrie de masse dans le but de séquencer des oligosaccharides sans préparations ou modifications chimiques ainsi que sans étalons.

Cette méthode de séquençage a été appliquée à des oligosaccharides de différentes tailles (tétra- ou pentasaccharides) afin d'identifier la position d'une désacétylation, ou de déterminer la nature de l'acide hexuronique dont l'oligosaccharide était constitué, à savoir un acide iduronique ou un acide glucuronique. Enfin le couplage de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie infrarouge a permis de valider la composition d'échantillons de chondroïtine sulfate, en identifiant la position du groupement sulfate sur des disaccharides mais aussi dans le cas d'un tétrasaccharide disulfaté. Ces différents cas sont prometteurs pour une généralisation de cette méthode, mais il faut pour cela compléter la base de données des monosaccharides et disaccharides de référence ainsi qu'identifier les limites de cette technique vis-à-vis de la taille maximale des échantillons qu'il est possible de séquencer. De plus, les performances de cette méthode de séquençage couplant spectrométrie de masse et spectroscopie infrarouge doivent être explorées sur des cas d'oligosaccharides complexes, branchés ou symétriques et l'usage d'autres méthodes de fragmentation que la CID peut être envisagé comme EID ou une source laser hautement énergétique afin d'étendre la couverture de séquence. Enfin pour appliquer cette méthode à des échantillons biologiques, il semble nécessaire de coupler cet instrument avec une source nanospray qui est plus adaptée pour l'analyse d'échantillons en faibles quantités.

Enfin, pour aller plus loin, deux couplages supplémentaires ont été proposés et discutés dans ce travail de thèse afin de dépasser les limitations liées à la technique dans le cas de mélanges d'isomères. Le

premier couplage consiste à utiliser un second laser afin de photofragmenter spécifiquement l'une des formes présentes dans le mélange en amont de la réalisation du spectre vibrationnel. Des résultats prometteurs ont été obtenus sur les anomères α et β de la glucosamine qui ont pu être séparés à l'aide de cette méthode spectroscopique en utilisant le laser à électrons libres FELIX. Dans l'optique de l'utilisation d'un tel couplage en laboratoire, une version de ce schéma spectroscopique utilisant la combinaison du dispositif expérimental avec un second laser OPO peut être envisagée et semble pertinente puisque la région infrarouge couverte autour de $3\ \mu\text{m}$ est suffisamment sensible et informative. Le second couplage présenté pour s'intéresser à des mélanges d'isomères consiste à séparer en amont du piégeage des ions et de leur étude spectroscopique les espèces présentes dans l'échantillon à l'aide d'une chromatographie liquide. Les spectres IRMPD d'espèces sélectionnées selon leur temps de rétention ont été réalisés mais des développements instrumentaux restent nécessaires pour exploiter parfaitement ce couplage. En particulier, le temps de réalisation d'un spectre IRMPD bien que descendu à moins de 7 minutes pour la gamme $2700\text{-}3700\ \text{cm}^{-1}$ reste trop long pour utiliser pleinement les avantages et le pouvoir de résolution de la chromatographie liquide.

Annexes

1. Analyse conformationnelle réalisée dans le cadre de la thèse de Loïc Barnes

Les spectres IRMPD et la recherche conformationnelle ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles réalisées pour la glucosamine et la *N*-acétyl glucosamine. Les spectres infrarouges théoriques des structures de plus basses énergies en accord avec l'expérience sont reportés pour les anomères α et β .

1.1. *N*-acétyl hexosamines

1.1.1. *N*-acétyl galactosamine

Le spectre IRMPD de la *N*-acétyl galactosamine est représenté entre 2700 et 3700 cm^{-1} sur la figure 105 et est comparé aux spectres infrarouges théoriques de la conformation de plus basse énergie pour chacun des deux anomères. Ces deux conformations sont des chaises de type 4C_1 avec une interaction entre le proton du carbonyle et l'oxygène en position 3, entre l'hydroxyle en position 3 et l'oxygène en position 4 et enfin entre l'hydroxyle en position 4 avec l'oxygène en position 6. Ces deux conformations suffisent pour décrire le spectre IRMPD de la *N*-acétyl galactosamine.

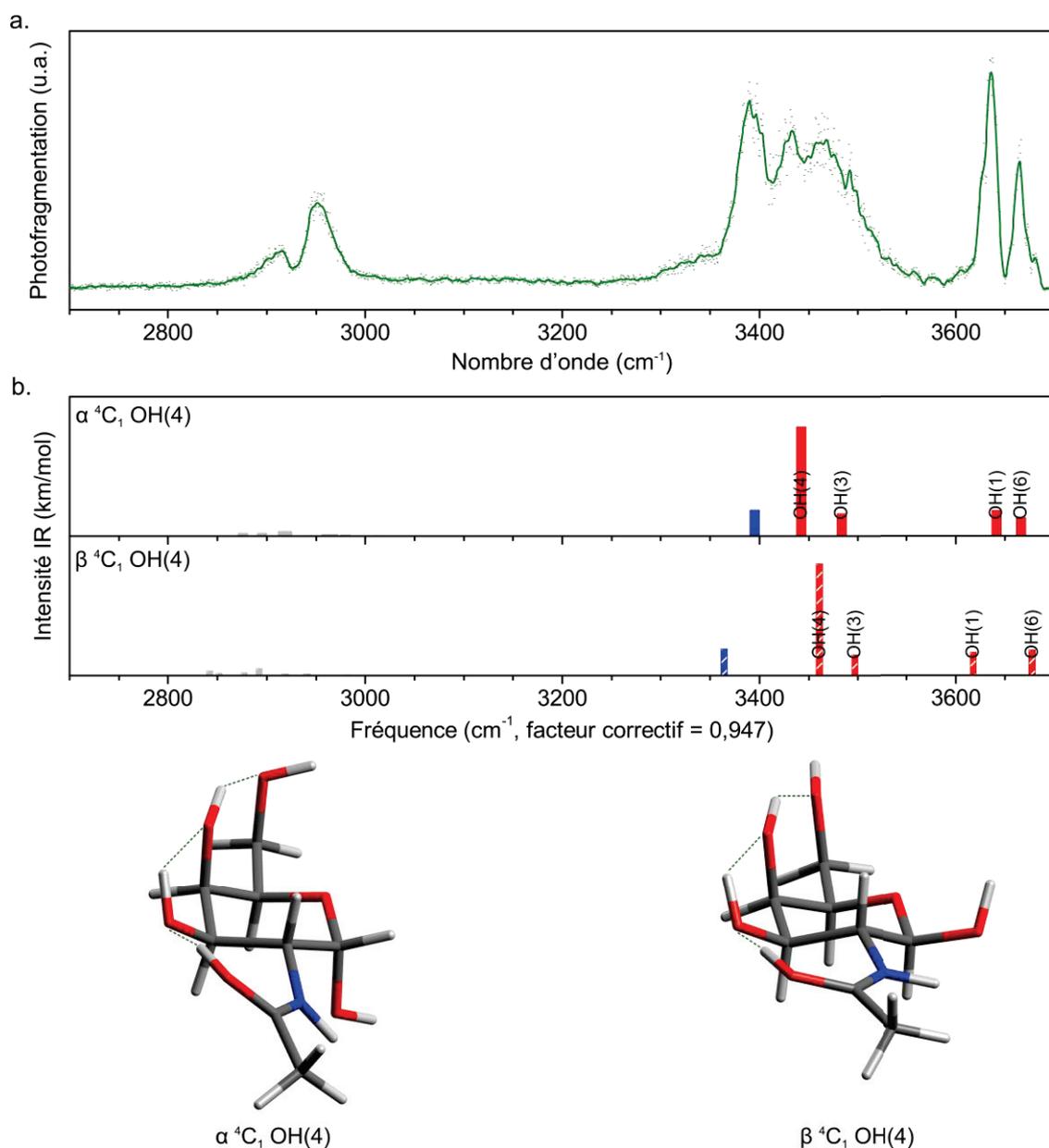


Figure 105 : Spectre IRMPD de la *N*-acétyl galactosamine entre 2700 et 3700 cm⁻¹ (a) comparé aux spectres IR théoriques (b) calculés par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd). Un facteur correctif de 0,947 est appliqué aux fréquences théoriques et un code couleur est attribué pour identifier les différents modes d'élongation : en gris sont représentés les modes CH, en bleu les modes NH, et en rouge les modes OH du cycle osidique. Les modes de vibration de l'anomère β sont hachurés.

1.1.2. *N*-acétyl mannosamine

Le spectre IRMPD de la *N*-acétyl mannosamine est représenté entre 2700 et 3700 cm⁻¹ sur la figure 106 et il est comparé aux spectres infrarouges théoriques de la conformation de plus basse énergie pour chacun des deux anomères. Ces deux conformations sont des chaises de type ⁴C₁ mais les interactions intramoléculaires diffèrent selon les anomères. La conformation de l'anomère α est caractérisée par une interaction entre le proton du carbonyle et l'oxygène en position 3, entre l'hydroxyle en position 3 et l'oxygène en position 4 et enfin entre l'hydroxyle en position 4 avec l'oxygène en position 6. De son côté, l'anomère β possède une interaction en moins, celle entre l'hydroxyle en position 4 avec

l'oxygène en position 6. La prise en compte de ces deux conformations permet de décrire correctement le spectre expérimental

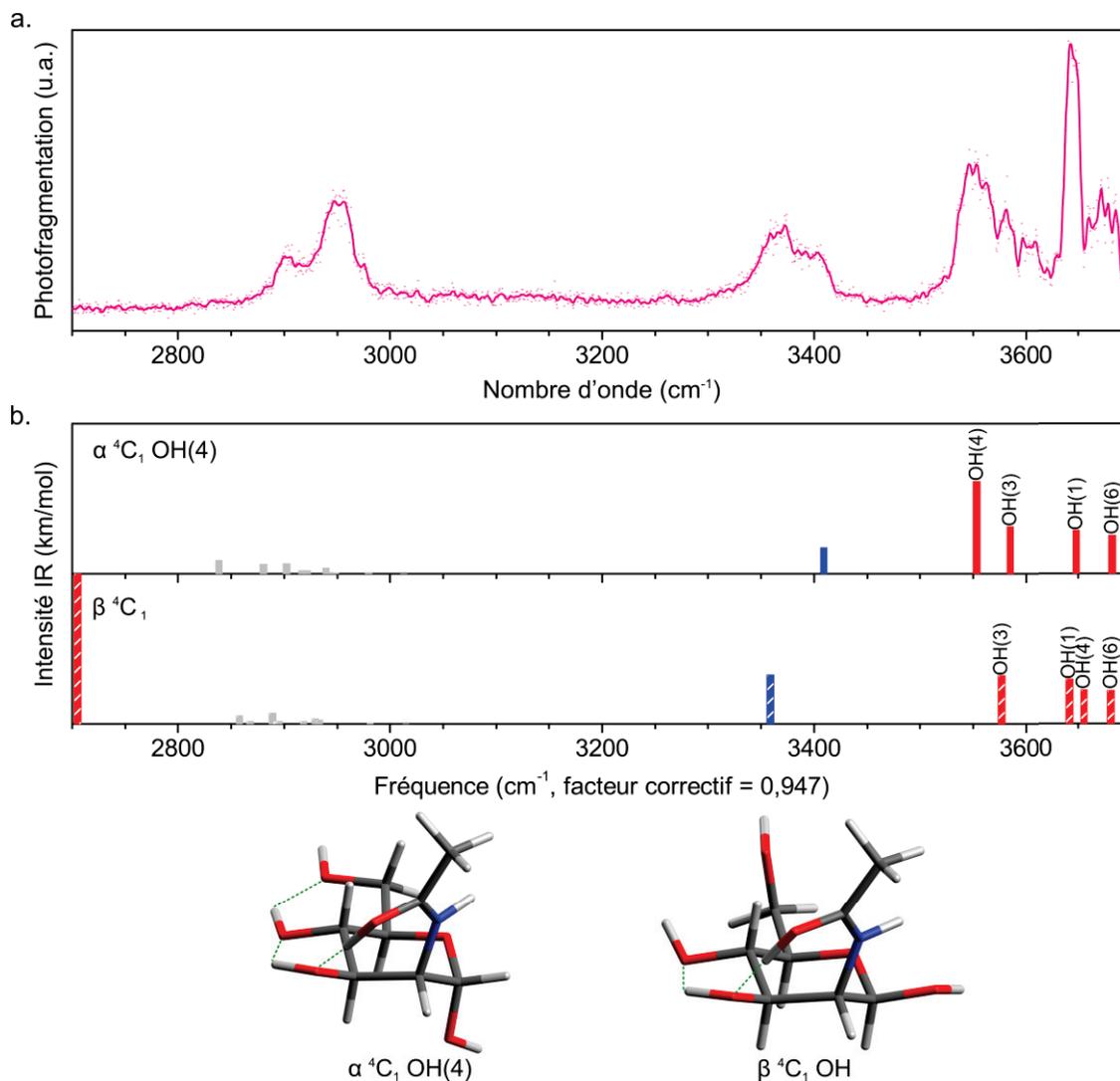


Figure 106 : Spectre IRMPD de la *N*-acétyl mannosamine entre 2700 et 3700 cm^{-1} (a) comparé aux spectres IR théoriques (b) calculés par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd). Un facteur correctif de 0,947 est appliqué aux fréquences théoriques et un code couleur est attribué pour identifier les différents modes d'élongation : en gris sont représentés les modes CH, en bleu les modes NH, et en rouge les modes OH du cycle osidique. Les modes de vibration de l'anomère β sont hachurés.

1.2. Hexosamines

1.2.1. Galactosamine

Le spectre IRMPD de la galactosamine est représenté entre 2700 et 3700 cm^{-1} sur la figure 107 et il est comparé aux spectres infrarouges théoriques de la conformation de plus basse énergie pour chacun des deux anomères. Ces deux conformations sont des chaises de type 4C_1 avec une interaction entre l'hydroxyle en position 4 et l'oxygène en position 6 et permettent de décrire le spectre IRMPD.

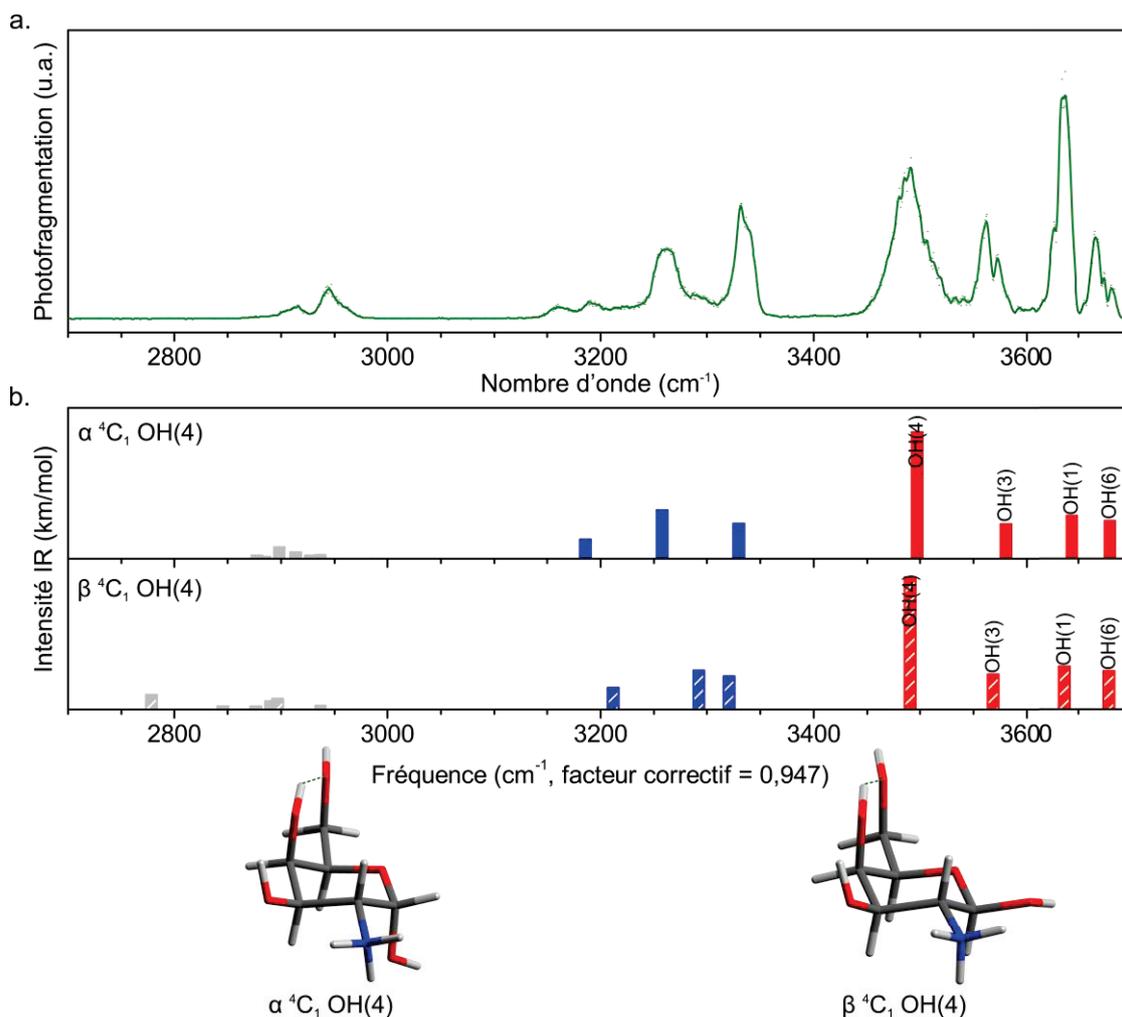


Figure 107 : Spectre IRMPD de la galactosamine entre 2700 et 3700 cm⁻¹ (a) comparé aux spectres IR théoriques (b) calculés par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd). Un facteur correctif de 0,947 est appliqué aux fréquences théoriques et un code couleur est attribué pour identifier les différents modes d'élongation : en gris sont représentés les modes CH, en bleu les modes NH, et en rouge les modes OH du cycle osidique. Les modes de vibration de l'anomère β sont hachurés.

1.2.2. Mannosamine

Le cas de la mannosamine est plus complexe, lors de la recherche conformationnelle, plusieurs formes de basses énergies sont observées et représentées sur la figure 108. Pour l'anomère α la conformation de plus basse énergie est une conformation de type ²E puis une chaise de type ⁴C₁ est observée à 1,1 kJ/mol. De même pour l'anomère β où la chaise ⁴C₁ n'est pas la conformation de plus basse énergie (+ 0,6 kJ/mol) puisqu'une forme stabilisée par des interactions entre l'amine et l'oxygène en position 3 est présente (⁰S₄).

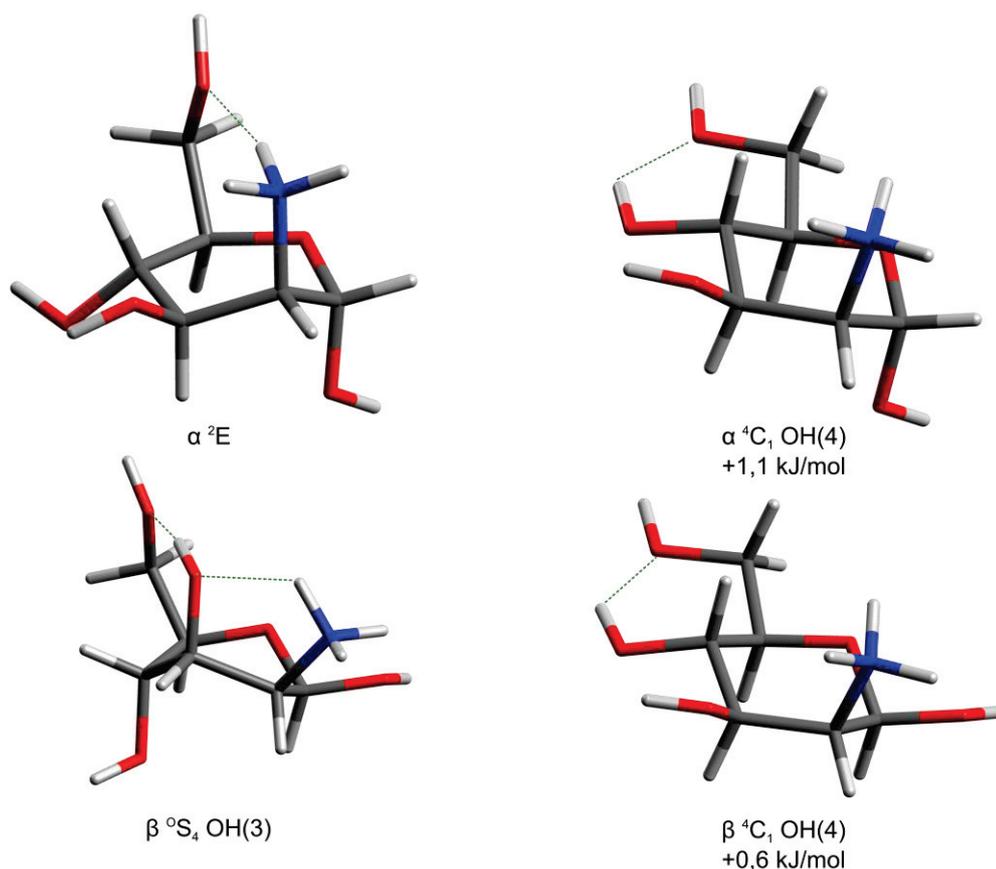


Figure 108 : Conformations de basses énergies calculées par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd)

Le spectre IRMPD de la mannosamine est représenté entre 2700 et 3700 cm^{-1} sur la figure 109 et il est comparé aux spectres infrarouges théoriques des conformations de plus basses énergies pour chacun des deux anomères. En effet, contrairement à la galactosamine, et tout comme la glucosamine, la conformation de plus basse énergie pour chacun des anomères ne suffit pas pour décrire correctement le spectre IRMPD puisque la bande expérimentale observée à 3550 cm^{-1} n'est observée dans aucune des conformations de plus basse énergie des anomères α et β . Toutefois, la seconde conformation obtenue par la recherche conformationnelle est très proche en énergie, c'est une chaise de type 4C_1 avec une interaction entre l'hydroxyle en position 4 et l'oxygène en position 6. Elle est présente à la fois pour les anomères α et β et possède bien un mode de vibration autour de 3552 cm^{-1} .

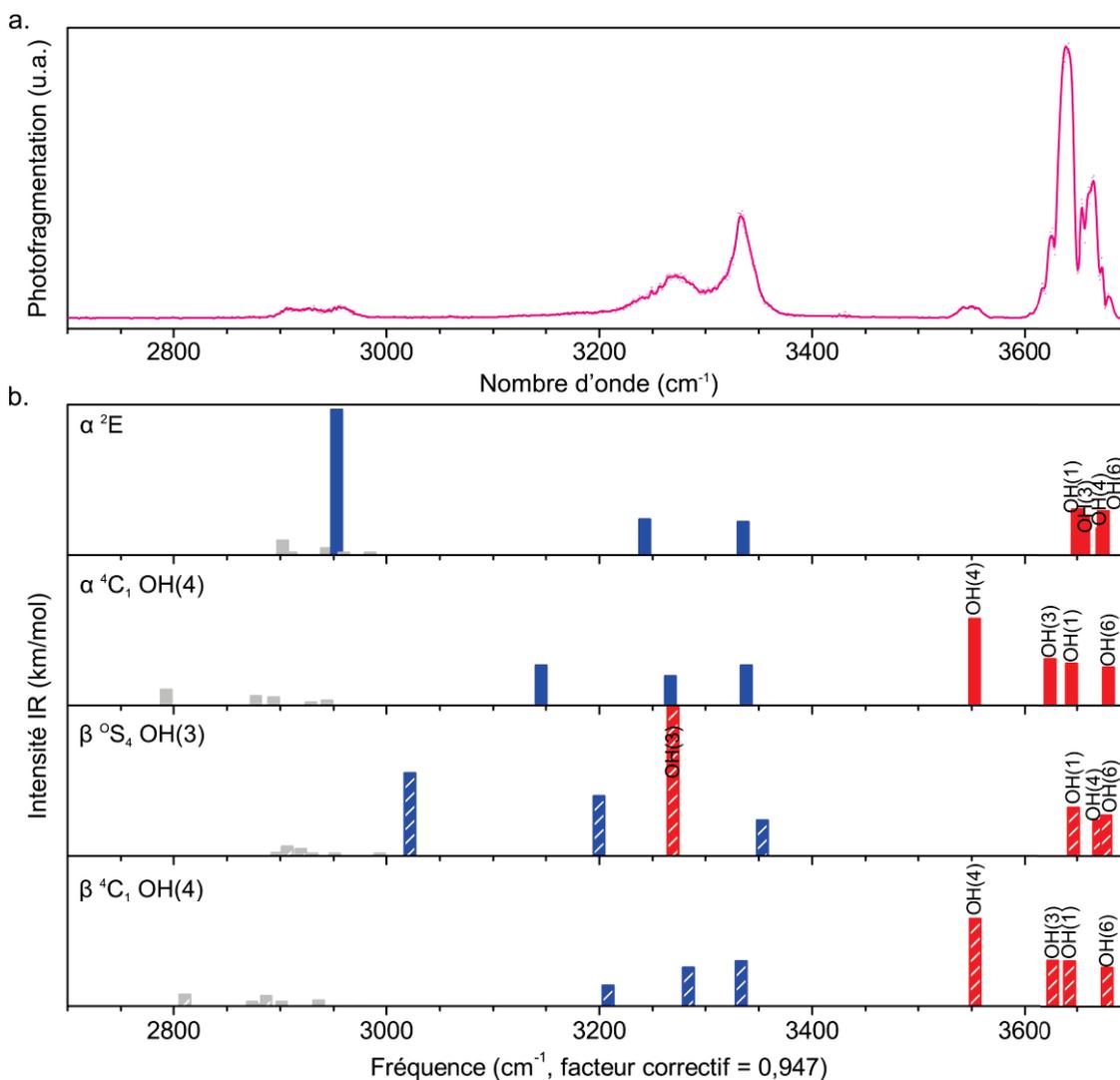


Figure 109 : Spectre IRMPD de la mannosamine entre 2700 et 3700 cm^{-1} (a) comparé aux spectres IR théoriques (b) calculés par DFT CAM-B3LYP/6-311++G(2df,2pd). Un facteur correctif de 0,947 est appliqué aux fréquences théoriques et un code couleur est attribué pour identifier les différents modes d'élongation : en gris sont représentés les modes CH, en bleu les modes NH, et en rouge les modes OH du cycle osidique. Les modes de vibration de l'anomère β sont hachurés.

2. Articles en collaboration

2.1. Insights into the fragmentation pathways of gas-phase protonated sulfoserine

Cet article, figure 110, est le fruit d'une collaboration avec l'équipe de Nick Polfer de l'université de Floride. Les co-auteurs sont : Amanda L. Patrick, Corey N. Stedwell, Baptiste Schindler, Isabelle Compagnon, Giel Berden, Jos Oomens et Nicolas C. Polfer. (IJMS379(2015)26-32)

The fragmentation chemistry of protonated sulfoserine was probed using a combination of collision-induced dissociation (CID) mass spectrometry, infrared multiple photon dissociation (IRMPD) spectroscopy, and density functional theory (DFT) calculations. The IRMPD spectra of the dominant fragment ions at m/z 106 and 88 (i.e., loss of SO_3 and H_2SO_4) were obtained and used to determine the

corresponding structures. By comparison to a synthetic standard and calculations, it was determined that the m/z 106 ion is structurally identical to protonated serine. The m/z 88 fragment ion was assigned an aziridine structure based on a comparison to theory, analogous to the structure previously proposed by others for phosphoric acid loss from phosphoserine. This work provides the first spectroscopic insights into the dissociation pathways of a sulfated amino acid, laying the groundwork for future studies on related amino acids and peptides with this important, labile post-translational modification.

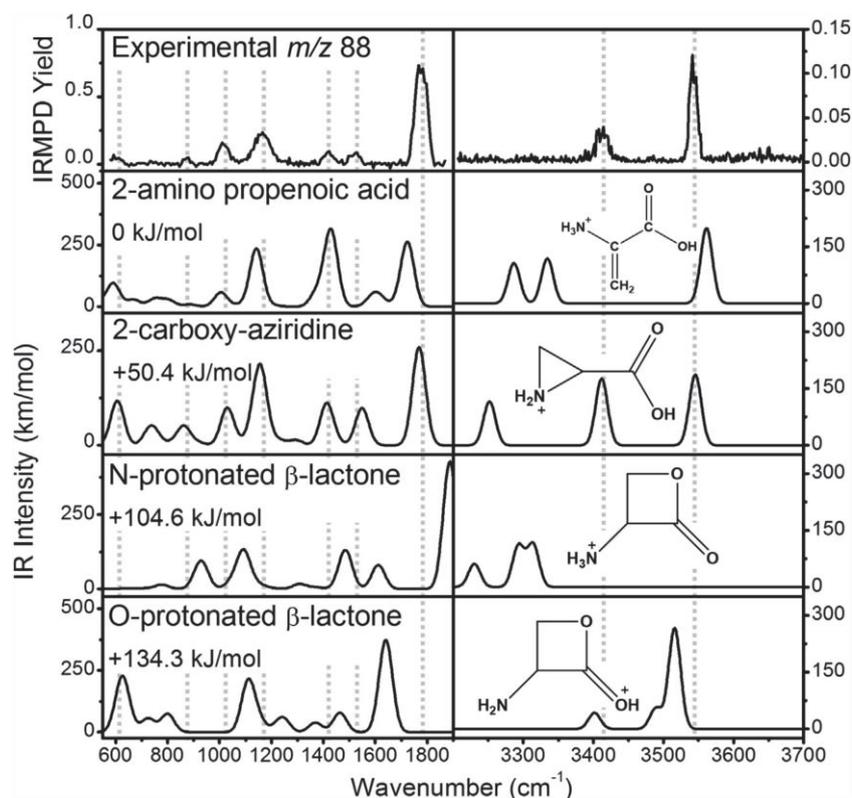


Figure 110 : Comparaison du spectre IRMPD du fragment de $m/z = 88$ et des les spectres IR théoriques de différentes structures d'après IJMS379(2015)26-32

2.2. Exploring the catalytic mechanism of ATP conversion at the molecular level: Binding and docking probed by Mass Spectrometry

Cet article, figure 111, est le fruit d'une collaboration avec l'équipe de Anouk Rijs de l'université de Nijmegen. Les co-auteurs sont : Bin Yan, Koen K.W. van Asseldonk, Baptiste Schindler, Isabelle Compagnon and Anouk M. Rijs. (en cours de revision)

Adenosine-5'-triphosphate (ATP) is the coenzyme selected by nature to provide energy for its cellular processes through the ATP hydrolysis reaction. Although, the crystal structure and the general working principle of numerous ATP hydrolases (ATPases) are generally known, this omnipresent ATP conversion reaction is yet poorly understood at the level of local interactions. Questions such as "Why is ATP

selectively bound to the active sites of ATPases?” and “Why is the conversion of ATP to ADP preferred over other reactions at the active site?” await detailed answers at the molecular level. Here, mass spectrometry (MS) based techniques are applied to answer these questions. Under controlled conditions, we have been able to activate the ATP conversion reaction within the peptide environment. Moreover, the MS based bottom-up approach provides us with the desired level of detail on the specificity and strength of the nucleotide-peptide recognition.

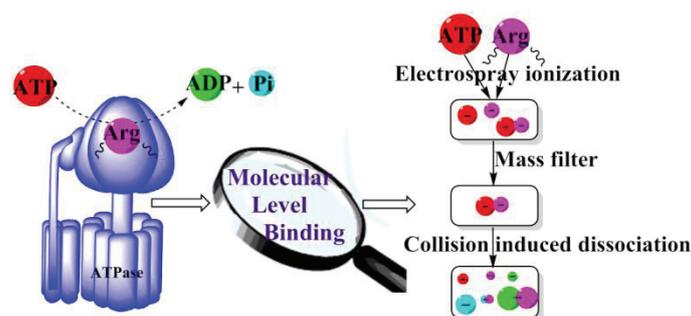


Figure 111 : Schéma de l'étude des complexes ATP et peptides modèles pour l'étude de l'ATPase

2.3. Bottom-up elucidation of the stereochemistry of the glycosidic bond

Cet article, figure 112, est le fruit d'une collaboration avec l'équipe de Sabine Flitsch de l'université de Manchester. Les co-auteurs sont : C. J. Gray, B. Schindler, L. G. Migas, M. Pičmanová, A. R. Allouche, A. P. Green, S. Mandal, M. S. Motawie, R. Sánchez-Pérez, N. Bjarnholt, B. L. Møller, A. M. Rijs, P. E. Barran, I. Compagnon, C. E. Evers et S. L. Flitsch. (en révision)

The lack of robust, rapid and high-throughput analytical strategies that can conclusively map the structure of glycans has significantly hampered basic and applied advances in glycoscience. The most fundamental problem is the resolution of the anomeric α/β glycan configuration. Here, we show for the first time that a 'memory' of anomeric configuration is retained following gas-phase glycosidic bond fragmentation during tandem mass spectrometry (MS^2). By integrating MS^2 with ion mobility spectrometry ($IM-MS^2$) we report a strategy to identify α - and β -linkages within natural underivatized carbohydrates. This is supported by IR-MS action spectroscopy and ab initio calculations. Quantum mechanical calculations provide candidate geometries for the anomeric fragment ions, in turn shedding light on gas-phase dissociation mechanisms of glycosidic linkages. We have applied this fragment-based hyphenated MS technology to oligosaccharide standards and to de novo sequencing of purified plant metabolite glycoconjugates, showing that the signature for anomericity is also observable fragments derived from larger glycans.

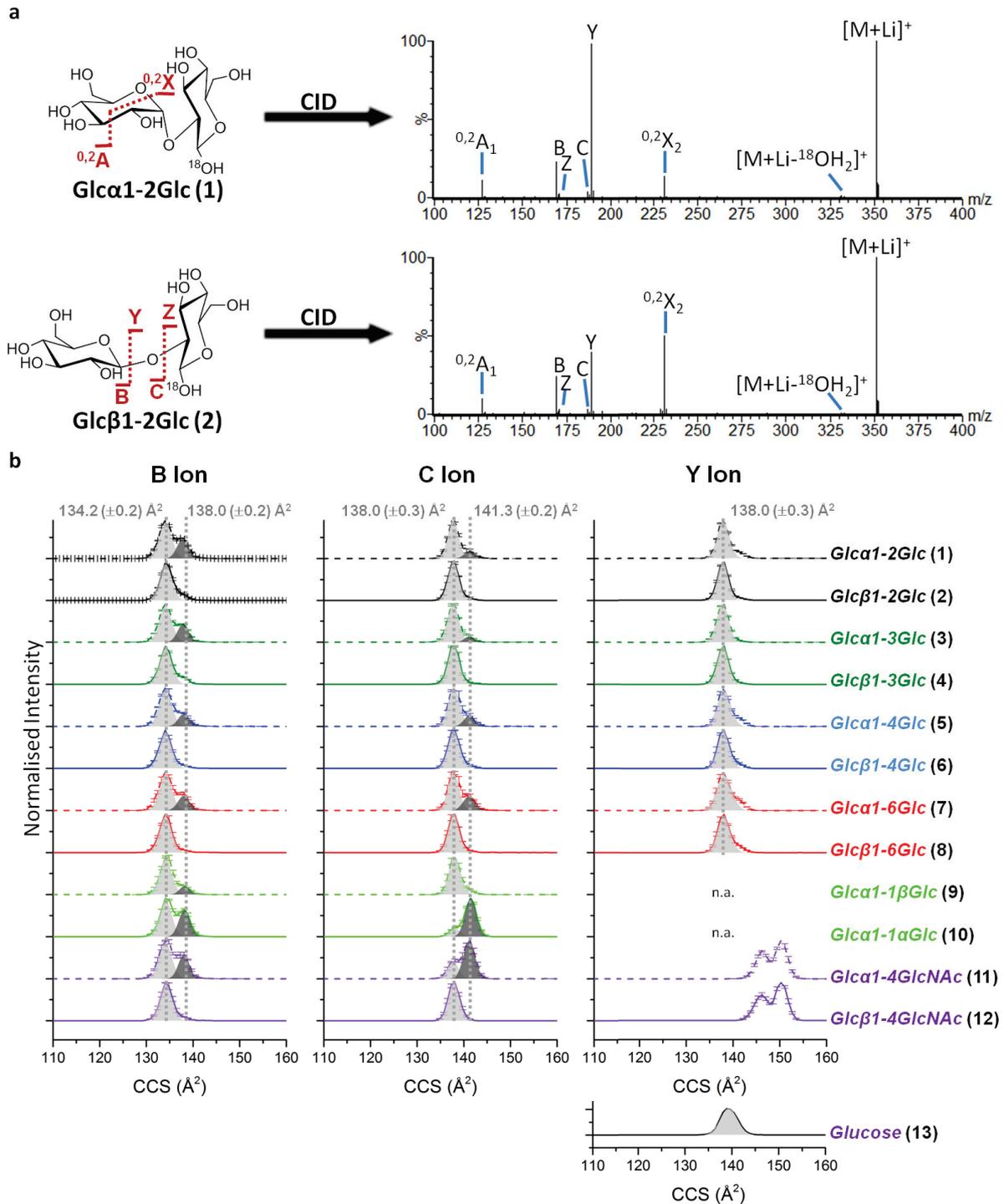


Figure 112 : Analyse en mobilité ionique des différents fragments de disaccharides

3. Liste d'articles

11. Wattjes, J; Schindler, B.; Trombotto, S; David, L; Moerschbacher, B.M.; Compagnon, I. Discrimination of patterns of N-acetylation in chitooligosaccharides by gas phase IR spectroscopy integrated to mass spectrometry (soumis)
10. Gray, C.J.; Schindler, B.; Migas, L.G.; Pičmanová, M.; Allouche, A.-R.; Green, A. P.; Mandal, S.; Motawie, M. S.; Sánchez-Pérez, R.; Bjarnholt, N.; Møller, B. L.; Rijs, A. M.; Barran, P. E.; Compagnon, I.; Evers, C. E.; Flitsch, S. L. Bottom-up elucidation of the stereochemistry of the glycosidic bond (en révision)
9. Bin Yan, Koen K.W. van Asseldonk, Baptiste Schindler, Isabelle Compagnon and Anouk M. Rijs. Exploring the catalytic mechanism of ATP conversion at the molecular level: Binding and docking probed by Mass Spectrometry (en révision)
8. Schindler, B.; Barnes, L.; Gray C.J.; Allouche, A.-R.; Chambert, S.; Fort, S.; Flitsch, S.; Loison, C.; Compagnon, I. Spectroscopy-enabled comprehensive *de novo* sequencing of underivatized carbohydrates (en révision)
7. Schindler, B.; Barnes, L.; Renois-Predelus, G.; Gray C.J.; Chambert, S.; Flitsch, S. L.; Oomens, J.; Daniel, R.; Allouche A.-R.; Compagnon, I. IRMPD spectroscopy sheds new (infrared) light on the sulfate pattern of carbohydrates. *Journal of Physical Chemistry A* **2017**
6. Schindler, B.; Renois-Predelus, G.; Bagdadi, N.; Melizi, S.; Barnes, L.; Chambert, S.; Allouche, A.-R.; Compagnon, I. MS/IR, a New MS-Based Hyphenated Method for Analysis of Hexuronic Acid Epimers in Glycosaminoglycans. *Glycoconjugate Journal* **2016**
5. Barnes, L.; Schindler, B.; Compagnon, I.; Allouche, A.-R. Fast and Accurate Hybrid QM//MM Approach for Computing Anharmonic Corrections to Vibrational Frequencies. *Journal of Molecular Modeling* **2016**, *22* (11)
4. Lorient, V.; Marciniak, A.; Quintard, L.; Despré, V.; Schindler, B.; Compagnon, I.; Concina, B.; Celep, G.; Bordas, C.; Catoire, F.; Constant, E.; Lépine, F. Resolving XUV Induced Femtosecond and Attosecond Dynamics in Polyatomic Molecules with a Compact Attosecond Beamline. *Journal of Physics: Conference Series* **2015**, *635* (1), 12006
3. Barnes, L.; Schindler, B.; Allouche, A.-R.; Simon, D.; Chambert, S.; Oomens, J.; Compagnon, I. Anharmonic Simulations of the Vibrational Spectrum of Sulfated Compounds: Application to the Glycosaminoglycan Fragment Glucosamine 6-Sulfate. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (39), 25705–25713
2. Patrick, A. L.; Stedwell, C. N.; Schindler, B.; Compagnon, I.; Berden, G.; Oomens, J.; Polfer, N. C. Insights into the Fragmentation Pathways of Gas-Phase Protonated Sulfoserine. *International Journal of Mass Spectrometry* **2015**, *379*, 26–32
1. Schindler, B.; Joshi, J.; Allouche, A.-R.; Simon, D.; Chambert, S.; Brites, V.; Gaigeot, M.-P.; Compagnon, I. Distinguishing Isobaric Phosphated and Sulfated Carbohydrates by Coupling of Mass Spectrometry with Gas Phase Vibrational Spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (40), 22131–22138

Caractérisation structurale et séquençage de carbohydrates par spectroscopie infrarouge intégrée à la spectrométrie de masse

Des techniques de séquençage existent pour les biopolymères comme les protéines et l'ADN et ont permis de révolutionner la biologie moderne. Toutefois, des techniques similaires dédiées au séquençage des carbohydrates n'ont pas encore été développées à cause de la complexité de cette classe de biomolécules. Dans ce contexte, nous avons construit un instrument couplant spectroscopie vibrationnelle et spectrométrie de masse (MS/IR) afin de caractériser la structure des carbohydrates grâce à leur signature infrarouge.

Dans cette thèse, nous avons démontré que cette métrique permet de différencier les différentes isoméries présentes dans la classe des carbohydrates : la nature des monosaccharides, la position des modifications fonctionnelles ainsi que la régio- et la stéréochimie de la liaison glycosidique. Ensuite la conservation de la structure moléculaire des ions après fragmentation a été démontrée sur des fragments de disaccharides permettant ainsi d'établir les règles du séquençage de carbohydrates par MS/IR. Cette méthode a ensuite été appliquée sur différents oligosaccharides.

Enfin dans la dernière partie de ce manuscrit, le potentiel de la spectroscopie IRMPD dans l'infrarouge lointain est exploré pour la résolution des anomères, des isomères et des conformations. Finalement deux approches permettant une séparation en masse et en isomère en amont de l'analyse spectroscopique sont proposées : spectroscopie IRMPD 2 couleurs ou couplage avec la chromatographie liquide.

Mots-clés : oligosaccharide, spectrométrie de masse, spectroscopie vibrationnelle, isomère, séquençage

Structural characterization and sequencing of carbohydrates by IR spectroscopy integrated into mass spectrometry

Sequencing techniques have been established for proteins and DNA and have revolutionised modern biology but similar technique do not exist for carbohydrates due to their unique complexity. In this context, we have built an instrument coupling vibrational spectroscopy and mass spectrometry (MS/IR) dedicated to the structural characterization of carbohydrates.

In this thesis, we have shown that the IR signature is a powerful metric which is able to resolve simultaneously all carbohydrate isomerisms: the monosaccharide content, the position of functional modifications, the regiochemistry and the stereochemistry of the glycosidic linkage. Then the conservation of the molecular structure of MS fragments has been revealed on disaccharide fragments. Following this demonstration we have established the carbohydrate sequencing rules using MS/IR and applied them for the determination of the sequence of different oligosaccharides.

Finally the potential of the IRMPD spectroscopy in the Far-IR range is explored for anomers, isomers and conformations resolution as well as the utilisation of a two colors infrared spectroscopy or the coupling with an HPLC instrument.

Keywords: oligosaccharide, mass spectrometry, vibrational spectroscopy, isomer, sequencing

Adresse du laboratoire :

Institut Lumière Matière
UMR5306 CNRS
Université Claude Bernard Lyon 1
Campus LyonTech - La Doua
Bâtiment Kastler, 10 rue Ada Byron
69622 Villeurbanne CEDEX, France